

Untersuchungen zur Aufklärung
des UV-Blau-Photoreceptors
bei *Neurospora crassa*

Angelika Reger

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0060

Untersuchungen zur Aufklärung des UV-Blau-Photoreceptors
bei Neurospora crassa

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Angelika Reger
aus München

Dezember 1987

1. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.1988

GLIEDERUNG

	Seite:
EINLEITUNG	1
A) Material und allgemeine Methoden	7
I. Pilzmaterial und Anzucht	7
II. Versuchsdurchführung	9
III. Extraktion und Pigmentbestimmung	10
B) Änderungen in der Fähigkeit zur lichtinduzierten Carotinoid- synthese	11
I. Wachstumskinetik und Kompetenz	11
1. Material und Methode	11
2. Kompetenz und Wachstumskinetik beim Wildstamm	13
a) Verlauf der Sporenkeimung	13
b) Wachstum des Myzels	15
c) Kompetenz zur lichtinduzierten Carotinoidsynthese	16
3. Wachstumskinetik und Kompetenz bei der rib-2-Mutante	20
a) Wachstum des Myzels	20
b) Kompetenz zur lichtinduzierten Carotinoidsynthese.....	21
II. Akkomodation	23
1. Material und Methode	23
2. Akkomodation beim Wildstamm	23
3. Akkomodation bei der rib-2-Mutante	24
III. Versuche zum "Gedächtnis" bei der Photoinduktion	25
1. Material und Methode	25
2. Ergebnisse	27
C) Untersuchungen zum Flavoproteinmuster im Zusammenhang mit der Lichtinduktion	28

	Seite:
I. Voraussetzungen	28
1. Die Wahl der Markierung	28
2. Überlegungen und Vorversuche zur Auftrennung von Flavoproteinen	28
3. Material und Methode	34
a) Versuchsdurchführung	34
b) Fraktionierung der Zellbestandteile	34
c) Solubilisierung	34
d) Gel-Elektrophorese	35
II. Das Flavoproteinmuster	37
1. Das Flavoproteinmuster im kompetenten Pilz	37
2. Änderungen während der Entstehung der Kompetenz	38
3. Änderungen bei der Akkomodation	43
III. Kurzfristige Auswirkungen einer Belichtung auf das Protein- und Flavoproteinmuster von Membranen	45
1. Veränderungen der Membranzusammensetzung	45
2. Ausschluß der Nitratreduktase als möglicher Kandidat	53
DISKUSSION	55
ZUSAMMENFASSUNG	61
LITERATURVERZEICHNIS	65

EINLEITUNG

Neben der Energielieferung für die Photosynthese spielt das Licht auch bei der Photomorphogenese, dem Photoperiodismus, wie auch der Photoregulation der Biosynthesen von pflanzlichen Farbstoffen eine entsprechende Rolle. Außer der Synthese von Chlorophyllen und Anthocyanen wird bei vielen Pflanzen auch die Carotinoidsynthese von Licht gesteuert (Zusammenfassung Rau, 1975). Im Gegensatz zur Photosynthese, wo der Photoreceptor - die Chlorophylle - eine Energieumwandlung bewerkstelligen, wirken die für Entwicklungs- und Bewegungsvorgänge verantwortlichen Photoreceptoren als "Sensoren". Die beiden wichtigsten dieser "Sensorpigmente" sind das Phytochrom und der für die Perzeption von UV- und Blaulicht verantwortliche Receptor, der auch Cryptochrom genannt wird. An Prozessen in der höheren Pflanze sind vielfach beide beteiligt (Mohr und van Nes, 1963).

Es gibt aber auch, vor allem bei Pilzen reine Blaulichteffekte, z.B. die Induktion der Konidien bei *Penicillium* oder *Trichoderma* (Lit.siehe Gressel und Rau, 1983). Der bekannteste Blaulicht-Effekt ist der Phototropismus z.B. bei der Avenakoleoptile (Shropshire und Withrow, 1958) oder bei den Sporangioophoren von *Phycomyces* (Shropshire, 1974).

Während man beim Phytochrom bei der Aufklärung des Photoreceptor-moleküls und seiner Primärreaktionen schon weit gekommen ist (Mohr und Oelze-Karow, 1973; Rüdiger und Scheer, 1983; Rüdiger, 1987), war die Suche nach dem Blaulichtreceptor und seiner Primärreaktionen bisher wenig erfolgreich.

Zur Aufklärung der Natur des Blaulichtphotoreceptors wurden u.a. Pilze wie *Phycomyces* oder *Neurospora crassa* gewählt, bei denen das Phytochrom fehlt (Schrott et al., 1981) und auch die Anzahl der durch Licht induzierten Reaktionen weit geringer als bei grünen Pflanzen ist.

Vergleicht man die Wirkungsspektren einiger Blaulichtreaktionen mit den Absorptionsspektren verschiedener Pigmente, so kristallisieren sich zwei Pigmente als mögliche Photorezeptorkandidaten heraus: zum einen ein Carotinoid und zum anderen Flavine.

Betrachtet man eine Reihe von Blaulicht-Wirkungsspektren, so sind sie durch einen Gipfel im nahen UV bei 370 nm, ein breites Maximum im Blaubereich mit einem Gipfel bei 440-450 nm, einer deutlichen Schulter bei 480 nm und einer kleineren Schulter bei 420 nm charakterisiert (Shropshire und Withrow, 1958; De Fabo et al., 1975; Lipson et al., 1984). Ein kleinerer Gipfel bei 280 nm wurde bei *Neurospora crassa* experimentell festgestellt (De Fabo et al., 1975). Vergleicht man nun die Wirkungsspektren mit den Absorptionsspektren der in Frage kommenden Pigmente, so fehlt dem Absorptionsspektrum eines Carotinoids, sofern es in der trans-Form vorliegt, ein Absorptionsgipfel bei 370 nm, dem Flavin die Dreigipfeligkeit des Spektrums zwischen 400 und 500 nm. Betrachtet man jedoch das Absorptionsspektrum eines Flavoproteins, so zeigt dieses eine Dreigipfeligkeit zwischen 400 und 500 nm (Massey et al., 1966). Aber auch Argumenten, die gegen ein Carotinoid sprechen, kann widersprochen werden, insofern, als ein cis-Carotinoid bzw. auch ein cis-Carotinoproteid einen Absorptionsgipfel bei 350 nm zeigt (Song, 1980). Gegen ein Carotinoid bzw. Carotinoproteid spricht jedoch die extreme Kurzlebigkeit des niedrigsten angeregten Sing lettzustandes, was ihm erschwert, als effizienter Photoreceptor zu wirken. Es gibt jedoch neuere Anhaltspunkte für die Existenz eines langlebigeren Sing lettzustandes (Kendrick et al., 1986). Ein Flavoprotein zeichnet sich durch einen langlebigen Sing lettzustand aus, kann somit als Photoreceptor effizient wirken und wird als wahrscheinlichster Kandidat angesehen.

Die Argumente für und wider die beiden Kandidaten wurden z.B. von Song (1980) und von Shropshire (1980) ausführlich diskutiert.

Ein Modell, wie man sich die Primärreaktionen des Cryptochroms vorstellen kann und das die Ergebnisse von Experimenten zur lichtinduzierten Carotinoidsynthese erklärt, ist in Abb.1 dargestellt.

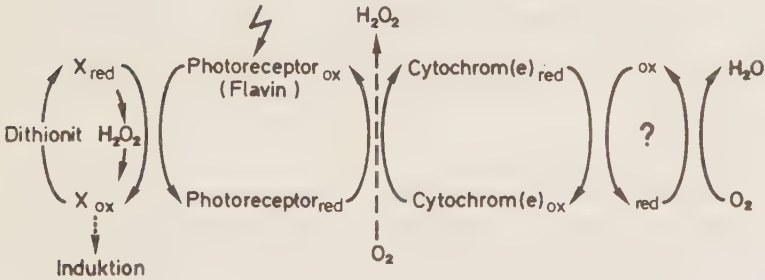


Abb.1:

Modell für die Primärreaktionen von Cryptochrom (Rau, 1980).

Dieses Modell berücksichtigt die Tatsache, daß die Induktion der Carotinoidbiosynthese bei *Fusarium aquaeductum* und *Neurospora crassa* auch ohne Sauerstoff möglich ist, jedoch für das Erreichen der optimalen Carotinoidmenge Sauerstoff essentiell ist, indem er den Photoreceptor in einem geeigneten Oxidationszustand hält (Rau, 1969). Ergebnisse von Experimenten, die zeigen, daß Wasserstoffperoxid Licht ersetzen kann und Dithionit eine bereits erfolgte Belichtung unterdrücken kann (Theimer und Rau, 1970), bringt dieses Modell dadurch zum Ausdruck, daß nur X_{ox} als Triggersubstanz eingezeichnet ist, nicht jedoch das reduzierte Cytochrom. Auch lichtinduzierte Absorptionsänderungen, sog. LIAC's, die durch eine Reduktion von Cytochrom bedingt sind (Brian et al., 1977), können mit diesem Modell erklärt werden.

Die Schwierigkeiten bei der Aufklärung des Photoreceptors liegen vor allem darin (sofern man vom wahrscheinlichsten Kandidaten, nämlich einem Flavoprotein ausgeht), daß ein Flavin das Coenzym

zahlreicher Flavoproteine ist, die in verschiedenen Teilen der Zelle vorkommen. Da sie alle potentielle Konkurrenten für die Absorption von Blaulicht sind, steigt die Wahrscheinlichkeit, daß der Photoreceptor in der Plasmamembran lokalisiert ist. Dies würde auch eine hochgradige Orientierung des Photoreceptors ermöglichen, die man z.B. zur Erklärung beim Polarotropismus von *Shaerocarpus* (Steiner, 1967) bzw. des Phototropismus von *Phycomyces* (Shropshire, 1974) als zwingend voraussetzen muß.

Ziel der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen war es nun zur Aufklärung des Blaulichtphotoreceptors einen Beitrag zu leisten. Dazu schienen einige Charakteristika der lichtinduzierten Carotinoidsynthese bei *Neurospora crassa* neue Ansatzpunkte zu bieten.

Eines dieser Charakteristika ist die sogenannte Kompetenz. Von *Sinapis alba* weiß man, daß erst ab einem bestimmten Alter Kotyledonen des Senfsämlings mit einer Anthocyansynthese, die durch Phytochrom gesteuert wird, auf Licht reagieren können (Steinitz et al., 1976). Der Zeitpunkt der Kompetenz-Entstehung liegt bei *Sinapis alba* 27 Stunden nach der Aussaat; er kann weder durch Behandlung mit Licht noch durch verschiedene Ernährungsbedingungen verschoben werden. Es ließ sich experimentell zeigen, daß der Photoreceptor im nicht-kompetenten Zustand funktionsfähig ist, wie auch der erste Schritt der Primärreaktionen ablaufen kann, während jedoch das Anthocyan synthetisierende System nicht induziert wird. Der Schritt für die Nicht-Kompetenz liegt also offenbar in der Transduktionskette.

Auch bei *Neurospora crassa* ist das Myzel bis zu einem gewissen Alter nicht fähig auf Licht mit der Bildung von Carotinoiden zu reagieren. Der Grund für die Nicht-Kompetenz könnte im Fehlen bzw. Defekt des Photoreceptors oder der Transduktionskette zu suchen sein. Daher bot sich dieser Organismus an, event. Informationen über die Signalkette bzw. den Photoreceptor zu bekommen.

Als Voraussetzung für die weiteren Untersuchungen mußte zunächst anhand des Verlaufs der Konidienkeimung und des Myzelwachstums der Zeitpunkt der Kompetenz-Entstehung ermittelt werden.

Da es sich, wie bereits erwähnt, beim Blaulichtphotoreceptor wahrscheinlich um ein Flavoprotein handelt, wurde dann untersucht, ob während der Kompetenz-Entstehung Veränderungen im Flavoproteinmuster zu beobachten sind.

Ein weiteres Charakteristikum der lichtinduzierten Carotinoidsynthese bei *Neurospora crassa*, das sich für Untersuchungen über Veränderungen in Flavoproteinmuster zur Aufklärung des Photoreceptors anbot, war die sogenannte "Akkommodation". Dabei handelt es sich um eine signifikant erhöhte lichtinduzierte Farbstoffsynthese nach Aufenthalt des Myzels in einem Minimalmedium im Vergleich zur Farbstoffbildung sofort nach Ernte des Myzels aus dem Vollmedium (Schrott, 1980). Wenn nun sowohl bei der Kompetenz-Entstehung wie auch bei der Akkommodation gleiche Veränderungen im Flavoproteinmuster zu beobachten wären, so könnten diese mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit dem Photoreceptor bzw. der Signalkette stehen.

Als ein dritter Ansatzpunkt für die Untersuchungen zum Blaulichtphotoreceptor schien ein weiteres Phänomen sinnvoll zu sein, nämlich das des "Gedächtnisses" bei der Photoinduktion ("memory effect"). Von der durch Phytochrom gesteuerten Anthocyansynthese bei *Sinopsis* ist bekannt, daß bereits vor Entstehung der Kompetenz der Photoreceptor vorhanden ist (Steinitz et al., 1976). Bei den Pilzen *Fusarium aquaeductum* und *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, daß im Myzel, in dem die lichtinduzierte Carotinoidsynthese durch Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinsynthese, blockiert war, Photoinduktion stattgefunden hat; wurde nämlich das Cycloheximid nach mehreren Stunden entfernt, dann bildeten beide Pilze auch ohne weitere Belichtung Carotinoide, sie haben also das "Signal" über einen längeren Zeitpunkt gespeichert (Rau, 1971; Rau und Rau-Hund, 1977).



Diese experimentellen Ergebnisse waren ein Anstoß auch nicht-kompetentes Myzel von *Neurospora crassa* auf ein "Gedächtnis" hin zu prüfen.

Experimentell wurde dabei so vorgegangen, daß nicht-kompetentes Myzel belichtet, anschließend im Dunkeln bis ins kompetente Alter weitergezogen und dann nach entsprechender Nachreaktionszeit die lichtinduzierte Carotinoidsynthese bestimmt wurde. Wenn solche Experimente zu einer lichtinduzierten Carotinoidsynthese führen, kann man daraus schließen, daß Photoreceptor im nicht-kompetenten Myzel vorliegt. Weitere Experimente, die eventuell die Möglichkeit bieten Primärreaktionen zu erfassen, sind solche mit kurzen Belichtungszeiten. Bei *Phycomyces* wurde gefunden, daß nach einer einminütigen Blaubelichtung in der Membranfraktion ein Flavoprotein gegenüber der Dunkelkontrolle verstärkt auftritt (Pollock et al., 1985). Deshalb wurde auch bei *Neurospora crassa* untersucht, ob man auf Protein- bzw. Flavoproteinebene Veränderungen bei kurzer Belichtung feststellen kann.

Um bei den eben beschriebenen Charakteristika von *Neurospora crassa* Änderungen im Flavoproteinmuster untersuchen zu können, mußte ein Organismus gefunden werden, der Riboflavin aufnimmt und einbaut. Entsprechende Einbauversuche beim Wildstamm führten zu keinem Erfolg. Deshalb wurde zusätzlich eine für Riboflavin auxotrophe Mutante auf die beschriebenen Phänomene hin untersucht. Um Flavoproteine erkennen zu können, wurde in den entsprechenden Versuchen mit radioaktivem ^{14}C -Riboflavin markiert.

A) Material und allgemeine Methoden

I. Pilzmaterial und Anzucht

Für die nachfolgend geschilderten Versuche dienten als Versuchsobjekte der Wildstamm (ATCC 10816) und die rib-2-Mutante (FGSC 1873) von *Neurospora crassa*.

Die gefriergetrockneten Konidien der Stammkultur wurden in der Tiefkühltruhe bei -18°C aufbewahrt. Zur Gewinnung der für die Submerskultur notwendigen Sporen wurde der Pilz in 200 ml-Erlmeyer-Kölbchen kultiviert, die mit 40 ml eines Nährbodens folgender Zusammensetzung gefüllt und autoklaviert waren:

Pro 1 Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$:

5 g	Ammoniumtartrat	}	= Fries'sches Minimalmedium
1 g	di-Ammoniumhydrogencitrat		
0,5 g	Magnesiumsulfat (7 Wasser)		
0,1 g	Natriumchlorid		
0,1 g	Calciumchlorid		
15 ml	Glyzerin		
2,5 g	Glucose		
2,5 ml	Malzextrakt (Diamalt Nr. 156)		
1 g	Kaliumdihydrogenphosphat		
0,5 g	Bacto-Pepton (Difco)		
2,5 g	Hefeextrakt (Difco)		
20 g	Agar (Serva)		

Aus dem "Kultivierkölbchen" wurde mittels einer sterilen Impfnadel Luftmyzel und Konidien in Anzuchterlenmeyerkölbchen übertragen, die 48 Stunden (bei der rib-2-Mutante ca. 10 Tage) bei 37°C bebrütet und anschließend 4 Tage bei Zimmertemperatur belassen wurden. Bei dieser

Kulturmethode bildet der Pilz am Luftmyzel reichlich Konidien. Diese wurden mit 2 % steriler Tween-20-Lösung abgeschwemmt und gesammelt. Die Zahl der gewonnenen Sporen wurde mittels einer Blutkörperzählkammer (Leitz) bestimmt. Von der Sporenabschwemmung wurde dann soviel in einem Kulturkolben (1 Liter Inhalt) mit 400 ml flüssiger Lährlösung eingimpft, daß die Sporendichte $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ betrug; die Kulturkolbennährlösung wurde folgendermaßen hergestellt:

Eine Stammlösung, das sogenannte "Vogelsmedium" (Vogel und Bonner, 1956) wurde aus 3 Lösungen gebildet, der Lösung a), b) und c).

Lösung a) enthält: 5,0 g Zitronensäure
5,0 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1,0 g $\text{Fe} (\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$
0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,05 g H_3BO_3
0,05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
in 95 ml Aqua dest bei Raumtemperatur gelöst

Lösung b) enthält: 10 mg Biotin
in 100 ml Aqua dest gelöst

Lösung c) enthält: 131 g Nacitrat $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
250 g $\text{K H}_2 \text{ PO}_4$
100 g $\text{N H}_4 \text{ NO}_3$
4,9 g $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
3,8 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
in nicht ganz 1 l Aqua dest gelöst

5 ml Lösung a), 2,5 ml Lösung b) wurden zusammen mit der Lösung c) auf 1 l Aqua dest aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde 1 : 50 verdünnt, 20 g Saccharose pro 1 Liter Nährlösung beigelegt, auf Kulturkolben verteilt (je 400 ml) und autoklaviert.

In je 400 ml dieser Nährlösung wuchsen die Kulturen bis zum gewünschten Alter des Myzels zu einer feinflockigen Pilzsuspension heran. Durch das Einbringen von Tween-20 mit der Konidienaufschwemmung wird die Bildung von Sporen im submers wachsenden Myzel verhindert (Zalokar, 1954).

II. Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurde der Pilz bei schwachem Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W, Lichtfarbe 15, hinter roter Plexiglasscheibe Röhm & Haas, Darmstadt Nr. 501), das keine Carotinoidbiosynthese induzieren kann (Zalokar, 1954; Rau, 1967a), von der Nährlösung abgenutzt. Durch anschließendes Spülen des Myzels mit destilliertem Wasser konnte die Nährlösung weitgehend herausgewaschen werden. Dabei wurde bei Sporen und bis zum Alter von 7,5 Stunden ein feinporigeres Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr. 595) bei älterem Myzel ein etwas grobporigeres Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr. 604) verwendet. Bei der Herstellung der Pilzsuspension wurde soviel H_2O dest zugegeben (0,15-1,7 l), daß eine Extinktion von ca. 0,220 bei λ 400 nm im Spektralphotometer (Firma Beckmann) gemessen werden konnte. Jeweils 75 ml der Stammsuspension wurden in Gaswaschflaschen pipettiert, die bereits 75 ml einer 1/30-m KH_2PO_4 -Lösung mit 4 % Glucose (Minimalmedium) enthielten. Weitere 27 ml der Myzelsuspension wurden zur Bestimmung des Trockengewichts entnommen, wobei drei Proben von je 9 ml in Wägegläschen pipettiert wurden. Die Gläschen wurden 24 Stunden lang bei $120^{\circ}C$ im Trockenschrank getrocknet, anschließend im Exsikkator bei Unterdruck abgekühlt und auf der Analysenwaage gewogen. Der Mittelwert aus diesen drei Proben ergab das Trockengewicht. Die Waschflaschen wurden dann zwischen zwei Belichtungsaggregaten angeordnet, deren 2 x 3 horizontal verlaufenden Leuchtstoffröhren (Philips TL 40 W/m²; Lichtfarbe 52) eine Lichtintensität von 14 W/m² lieferten. Ein Durchströmen der Proben mit Sauerstoff bewirkte neben

der Sauerstoffversorgung eine gleichmäßige Exposition der Hyphen während der Belichtung. Ein Ventilator hielt die Temperatur der Suspension während der Belichtungszeit konstant auf Zimmertemperatur. Die Dunkelwerte wurden entsprechend der Belichtungszeit mit Sauerstoff durchströmt und danach wie die belichteten Proben bis zum Ende der Nachreaktionszeit mit Luft durchströmt.

III. Extraktion und Pigmentbestimmung

Zur Extraktion des gebildeten Farbstoffes wurde das Pilzmyzel auf einem Büchnertrichter (Durchmesser 5 cm) von der Versuchslösung abfiltriert, mit dest. Wasser gewaschen, vom Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr.604 bzw. 595, vgl. Kap.A/II) abgezogen und in ein Plastikgefäß (100 ml) übergeführt. Das Plastikgefäß enthielt bereits 20 ml Methanol und 25 g Glasperlen (Durchmesser 4,8 mm). Das Myzel wurde in den Plastikbehältern durch 30-minütiges Schütteln (40-minütig bei Sporen) auf einer Schüttelmaschine weitgehend zerschlagen. Durch weitere Zugabe von 20 ml Aceton und erneutem 30- (bzw. 40-)minütigem Schütteln wurden die Pigmente aus dem Myzel herausgelöst.

Die so gewonnene Farbstofflösung wurde abgenutscht (Filterpapier Schleicher & Schüll Nr. 597) und das Myzel mit Aceton mehrmals gewaschen.

Der im Methanol/Aceton-Gemisch vorliegende Farbstoff ließ sich im Scheidetrichter mit Hilfe von 5 %iger Ammoniumsulfatlösung leicht in Petrolether (Kp: 40 bis 60⁰ C') übertreiben. Nach zweimaligem Waschen der Petroletherphase mit Aqua dest wurde die Petroletherphase eingedampft und der Rückstand je nach Konzentration der Carotinoide in 5 bzw. 10 ml Petrolether (Kp: 60 bis 80⁰C') aufgenommen. Anschließend wurden die Extinktionswerte der in Petrolether gelösten Carotinoide zwischen 380 und 560 nm im Spektralphotometer (Firma Kontron) gemessen, wobei alle 2 nm der Extinktionswert bestimmt wurde. Die ermittelten Extinktionswerte wurden vom Computer (PSI 480, Firma Kontron) im On-line-Verfahren gespeichert.

B) Änderungen in der Fähigkeit zur lichtinduzierten Carotinoidbiosynthese

I. Wachstumskinetik und Kompetenz

Wie bereits in der Einleitung erläutert, schien die Kompetenzentstehung ein Ansatzpunkt zur weiteren Untersuchung der Photoinduktion zu sein. Erste Hinweise ergaben sich durch die Beobachtung, daß Konidien auch ohne Belichtung stark orange gefärbt sind, Myzel jedoch erst nach Belichtung eine starke Pigmentbildung aufweist. Es mußte deshalb zunächst untersucht werden, ob Konidien noch zusätzlich durch Lichtinduktion Carotinoide synthetisieren können und ob Myzel von Beginn der Keimung an auf Licht reagieren kann oder ob es diese Fähigkeit erst erlangt. Dazu sollte insbesondere geprüft werden, wie das Wachstum des Pilzes verläuft und in welchem Stadium des Myzels Kompetenz vorhanden ist.

1.) Material und Methode

Zur Ermittlung des jeweiligen Trockengewichtes wurden die Werte bei verschiedener Kulturdauer (vgl. Kap. A)II) bestimmt. Anschließend wurden sie auf die Gesamtmenge der Pilzsuspension, die aus einem Kulturkolben gewonnen wurde, hochgerechnet. Für einen Teil der Stickstoff-Untersuchungen wurde die Methode nach Kjeldahl verwendet. Dazu wurden jeweils 5 ml "Stammsuspension" in 50 ml Kjeldahlkolben mit 2 ml konzentrierter H_2SO_4 mit einer Spatelspitze Katalysator ($\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$, 1:2) versetzt und in einem Aufschlußgerät (Firma Electrothermal) aufgeschlossen. Der zunächst im Reaktionsgemisch als Ammoniumsulfat gebundene Stickstoff wurde quantitativ in einem Wasserdampfdestillationsapparat (nach Parnas-Wagner) gebracht und mit einem Überschuß sechzigprozentiger NaOH versetzt. Danach konnte der Stickstoff als NH_3 abgetrennt, durch H_2O -Dampfdestillation in eine Vorlage mit 5 ml 0,02 n HCl übergeleitet und durch Rücktitration mit 0,02 n NaOH bestimmt werden.

Diese Methode war für die Bestimmung etwas größerer Mengen Stickstoff zwar sehr genau, aber sie hatte zwei Nachteile:

Zum ersten war sie für Stickbestimmung von 36 und mehr Proben pro Versuch mit viel Zeitaufwand verbunden und zum zweiten ist eine Bestimmung von Mikromengen (etwa 10 bis 50 µg) an Stickstoff mit dieser Methode praktisch nicht möglich. Deswegen wurde für die N-Bestimmung bei den meisten Versuchen die Ultramikromethode nach Strauch (1965) verwendet. Diese Methode wurde etwas abgeändert, und somit die Stickstoffbestimmungen folgendermaßen durchgeführt:

Es wurden 0,2 bis 0,5 ml "Stammsuspension" in 10 ml Duran-Reagenzgläser pipettiert und mit 0,4 ml des Aufschlußreagenzes (H_2SO_4 konzentriert + gesättigte K_2SO_4 -Lösung + Selen; siehe Strauch, 1965) versetzt. Gleichzeitig wurden Proben mit bekannten Konzentrationen von Lysin-monohydrochlorid für eine Eichkurve angesetzt.

Pilz- und Eichproben wurden nun in einem Thermoblock ("Thermochem" der Firma Liebisch Brackwede) ca. 4,5 Stunden lang aufgeschlossen, wobei die maximale Temperatur der letzten 2 Stunden bei 330°C lag. Das entstehende klare Reaktionsgemisch wurde bei Zimmertemperatur abgekühlt, mit 7 ml destilliertem H_2O und 2,8 ml frisch angesetztem, modifiziertem Nessler Reagenz (Nessler-Reagenz "A" und Nessler-Reagenz "B", 0,6 n di-Natriumtartrat und einer 0,2 %igen Suspension von Gummi-arabicum im Verhältnis 5:5:2:2) behandelt und 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden im Photometer bei der Wellenlänge 500 nm die Extinktionen der Eich- und Pilzproben gemessen. Die Stickstoffmenge ist dann aus der Eichkurve graphisch zu ermitteln. Das Nessler-Reagenz ist auf NH_3 außerordentlich empfindlich; kleine Mengen von Ammoniak ergeben mit dem Reagenz eine orange Lösung, während größere NH_3 -Mengen tiefbraune Fällungen verursachen. Um eine durch Fällungsreaktionen ungestörte Extinktionsmessung zu ermöglichen, wurde den Proben di-Natriumtartratlösung und Gummi-arabicum-Suspension zugegeben.

2.) Kompetenz und Wachstumskinetik beim Wildstamm

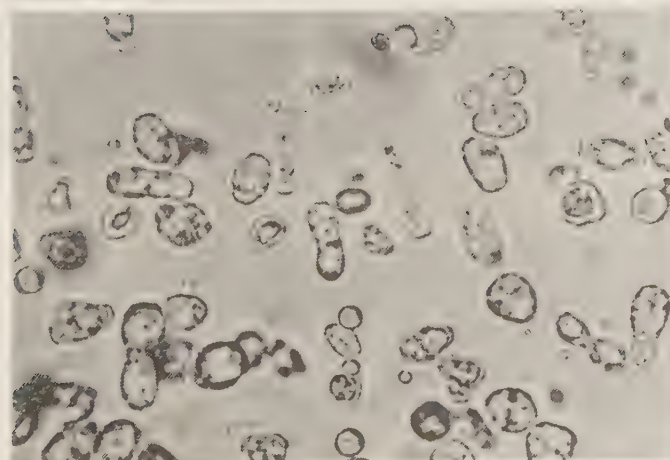
a) Verlauf der Sporenkeimung

Um Myzel unterschiedlicher Kulturdauer mikroskopieren zu können, wurde ein Kulturkolben mit Sporensuspension angeimpft und steril bei verschiedenem Alter etwas Pilzsuspension entnommen. Der Verlauf der Keimung ist in Abb.2 aus einigen repräsentativen Fotos zu entnehmen. In der angeimpften Suspension konnte man ausschließlich Sporen beobachten, während bei einer Kulturdauer von 4,5 Stunden deutlich Keimschläuche zu sehen sind (vgl. Bild 2, Abb.2). Erste Verzweigungen des Myzels treten erst nach 7 Stunden auf. Dagegen weist ein 18 Stunden altes Myzel schon zahlreiche Verzweigungen auf (vgl. Bild 4, Abb.2).

1



2



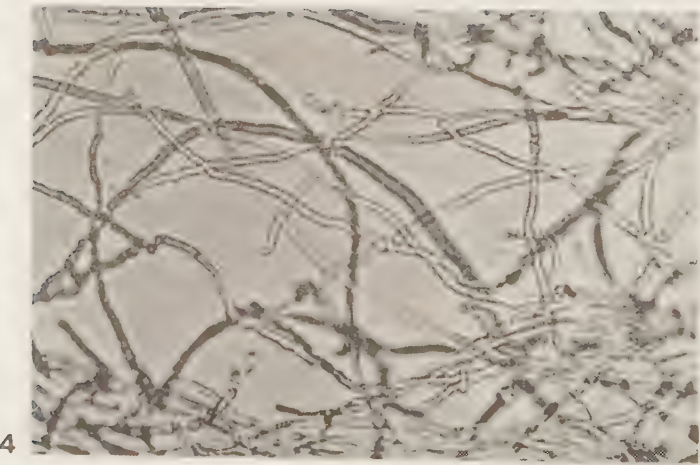


Abb.2:

Verlauf der Sporenkeimung, Fotos einiger Altersstadien: Bild 1: Kulturdauer von 2 Stunden mit Sporen und z.T. auskeimenden Sporen. Bild 2: Kulturdauer 4,5 Stunden, fortgeschrittene Keimstadien mit kurzen Keimschläuchen. Bild 3: Vergrößerung eines Keimschlauches. Bild 4: Ausdifferenziertes Myzel von 18 Stunden.

Die in Abb. 2 dargestellten mikroskopischen Daten waren gut reproduzierbar und konnten deshalb dazu dienen, das Wachstum des Myzels zu beobachten. Dies ermöglichte Altersstadien eindeutig zu identifizieren.

b) Wachstum des Myzels

Das Wachstum des Pilzmyzels wurde anhand der Ermittlung von Trockengewicht und Stickstoffgehalt bei verschiedener Kulturdauer verfolgt. Dabei ergaben sich die in Abb. 3 dargestellten Werte.

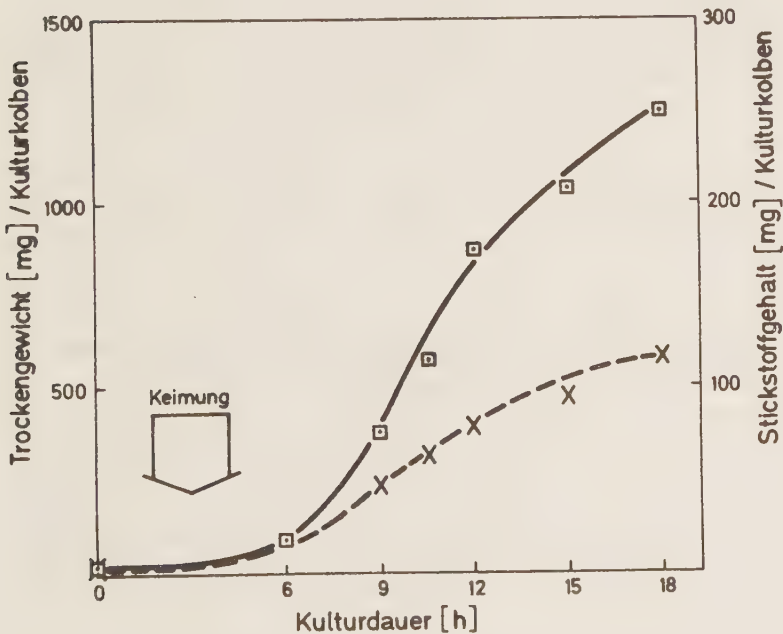


Abb.3:

Zunahme des Trockengewichtes ($\square$ — $\square$) und des Gesamt-Stickstoffs (x --- x) pro Kulturkolben bei verschiedener langer Kulturdauer beim Wildstamm

Wie daraus hervorgeht, steigt das Trockengewicht ab 6 Stunden sehr steil an. Die Zunahme des Stickstoffgehalts zeigt ebenfalls einen annähernd so steilen Verlauf, flacht jedoch ab 12 Stunden ab. Diese Tatsache könnte in einer vermehrten Einlagerung von Reservestoffen, wie z.B. Glykogen (vgl. elektronenmikroskopische Bilder, Kap. C)12.) begründet sein.

c) Kompetenz zur lichtinduzierten Carotinoidsynthese

Zur Prüfung, ob bereits die Sporen kompetent für eine lichtinduzierte Carotinoidsynthese sind, wurde Myzel im Dunkeln angezogen und bei Sicherheitslicht (vgl.Kap. A)II) die Sporen abgeschwemmt. Die gewonnene Sporensuspension wurde in Minimalmedium (siehe Kap. A)II) übergeführt und auf eine Sporendichte von 10^7 Sporen pro Waschflasche eingestellt. Verschiedene Waschflaschen dienten als Dunkelkontrollen, andere wurden unterschiedlich lang belichtet und nach ca. 10 Stunden der Gehalt an Carotinoiden bestimmt. Die dabei ermittelten Daten sind in Tab.1 dargestellt.

Tab.1: Carotinoidgehalt von Sporen im Dunkeln und nach verschiedenen langer Lichtinduktion. Die Extinktion wurde im Hauptabsorptionsmaximum in 10 ml Petrolether gemessen und zusätzlich in Prozent des 128'-Wertes dargestellt.

	Belichtungszeit							
	D	1'	4'	8'	16'	32'	64'	128'
Carotinoide [E/ 10^7 Sporen]	0,197	0,192	0,192	0,188	0,188	0,193	0,182	0,188
Carotinoide in % des 128'-Wertes	105	102	98	100	100	102	97	100

Vergleicht man die Extinktionswerte der belichteten Proben mit der Dunkelkontrolle, so ergibt sich keine durch Licht induzierte Carotinoidmenge.

Um den Verlauf der Kompetenz-Entstehung verschieden alten Myzels zu prüfen, wurde der Inhalt eines Kulturkolbens (bzw. mehrerer Kulturkolben, wenn es die Zahl der Parallelproben erforderte) in 0,150 - 1,7 l H_2O dest. aufgenommen. Bei der Herstellung der Pilzsuspension wurde soviel H_2O dest. verwendet, daß eine Extinktion von ca. 0,220 bei λ 400 nm im Spektralphotometer gemessen werden konnte. Jeweils 75 ml der Pilzsuspension wurden in Waschflaschen, die 75 ml Minimalmedium enthielten, pipettiert; einige Proben wurden belichtet, während andere als Dunkelkontrolle dienten. Die damit ermittelte Kompetenzkurve ist in Abb. 4 dargestellt.

Wie aus Tab. 1 und Abb. 4 hervorgeht, ist die Fähigkeit auf Licht mit der Bildung von Carotinoiden zu reagieren weder bei den Sporen noch bis zu einer Kulturdauer von 9 Stunden vorhanden, zeigt sich jedoch ab der Kulturdauer von 12 Stunden eindeutig.

Bei den in Abb. 4 dargestellten Daten wurde die Extinktion im Absorptionsmaximum als Maß für die Carotinoide verwendet. Diese Methode kann jedoch mit folgendem Fehler behaftet sein. Nach Abb.5 besteht bei gleichem Extinktionswert im Absorptionsmaximum (A_m) die Möglichkeit, daß ein Unterschied zwischen dem im Dunkeln und im Licht gebildeten Carotinoidgemisch besteht. So könnte man bei alleiniger Beurteilung auf Grund des Extinktionsmaximums zu einer Fehlinterpretation kommen.

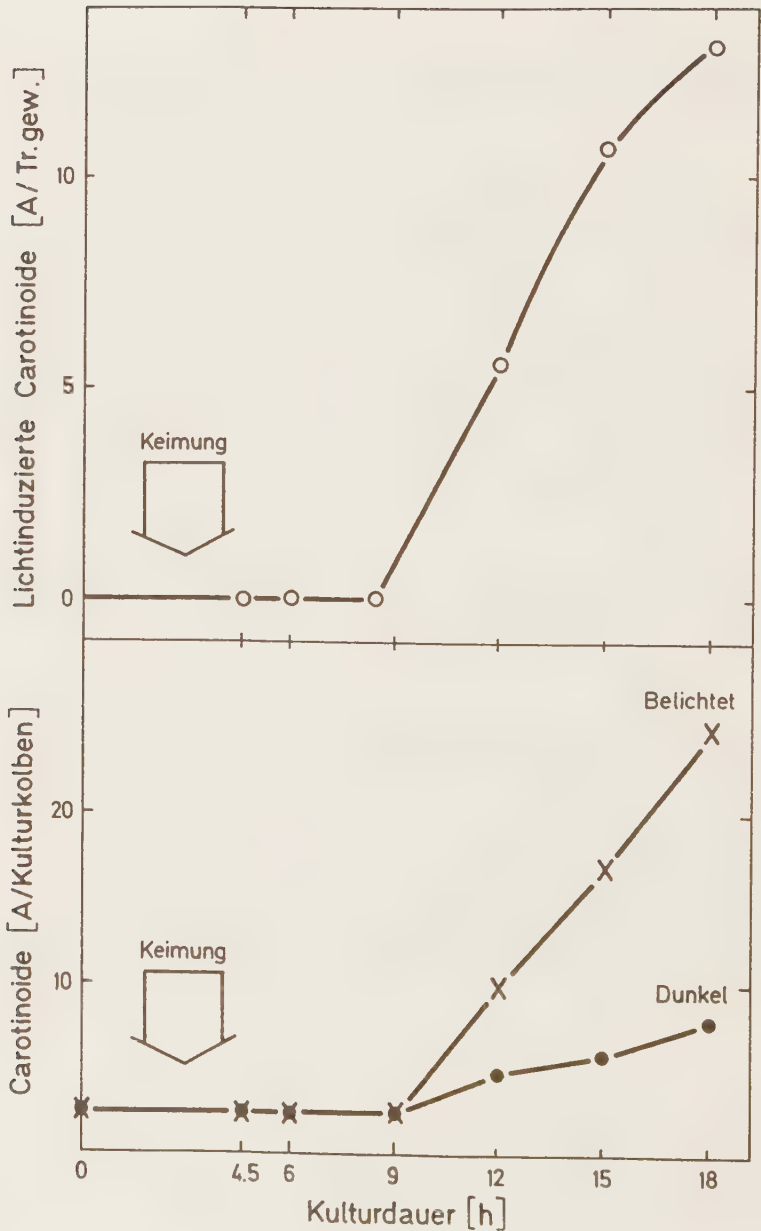


Abb.4:

Verlauf der Kompetenz-Entstehung für die lichtabhängige Carotinoidsynthese beim Wildstamm (zwei verschiedene Darstellungsweisen)

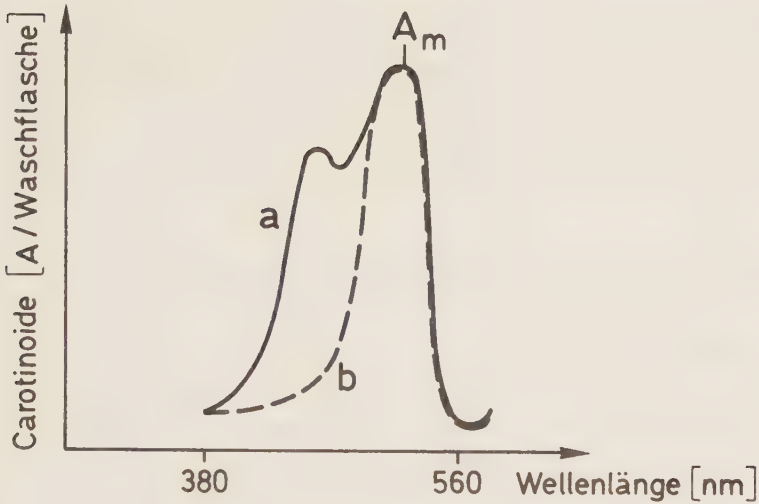


Abb.5:

Fiktive Absorptionsspektren zweier Carotinoidgemische (a,b)

Deshalb wurde zur Absicherung der in Abb. 4 präsentierten Daten auch die Form der Absorptionsspektren hereangezogen. Dazu wurden die Absorptionsspektren der im Dunklen und nach Belichtung synthetisierten Carotinoidgemische bei der jeweiligen Kulturdauer miteinander verglichen.

In allen Fällen, bei denen die Absorption im Maximum bei belichteten Proben und Dunkelpuben gleich war, war auch die Form der Absorptionsspektren gleich. Deshalb konnte die Extinktion im Maximum zur Darstellung der Kompetenzkurve verwendet werden.

Eine vorhandene bzw. nicht vorhandene Kompetenz könnte durch eine altersabhängige unterschiedliche Empfindlichkeit des verwendeten Myzels im Bezug auf die Induktionswirkung des Lichtes vorgetäuscht werden (Schrott, 1980; 1985). Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden Proben verschiedener Dichte unterschiedlich lang belichtet, um auf jeden Fall eine ausreichende Lichtinduktion zu gewährleisten.

Keine dieser Variationen führte jedoch dazu, daß bei jüngerem Myzel eine lichtinduzierte Carotinoidsynthese festgestellt werden konnte. Der Zeitpunkt der Kompetenz-Entstehung änderte sich nicht und die Kompetenz-Kurve konnte deshalb mit einheitlicher Myzeldichte und gleicher Belichtungszeit bei verschiedener Kulturdauer dargestellt werden.

3.) Wachstumskinetik und Kompetenz bei der rib-2-Mutante

a) Wachstum des Myzels

Wie bereits in der Einleitung erläutert, mußte für die Untersuchungen zum Flavoproteinmuster eine Mutante verwendet werden, die für Riboflavin auxotroph ist. Als Voraussetzung für diese Versuche mußte diese rib-2-Mutante zunächst daraufhin untersucht werden, ob sie sich im Wachstumsverlauf und in der Kompetenz-Entstehung vom Wildstamm unterscheidet. Dies erfolgte mit der gleichen Methodik wie beim Wildstamm (Kap.A)II und Kap. B)I.1).

Bei der rib-2-Mutante mußte jedoch zur Anzucht des Myzels zusätzlich 75 µg Riboflavin pro Kulturkolben zugegeben werden. Außerdem erhielt auch jede belichtete Probe und Dunkelkontrolle 15 µg pro Waschflasche, um die Versorgung mit Riboflavin während der Nachreaktionszeit zu gewährleisten.

Der Wachstumsverlauf ist anhand der Trockengewichtszunahme in Abb.6 dargestellt und ist dem des Wildstammes sehr ähnlich (vgl. Abb.6 mit Abb.3), d.h. das Trockengewicht des Myzels zeigt einen steilen Anstieg ab einer Kulturdauer von 7 Stunden, vorher hingegen nur eine schwache Zunahme. Auch beim Mikroskopieren von Myzelien verschiedener Altersstadien (Methode vgl. Kap. B I.2) ergab sich kein Unterschied zwischen dem Wildstamm und der rib-2-Mutante.

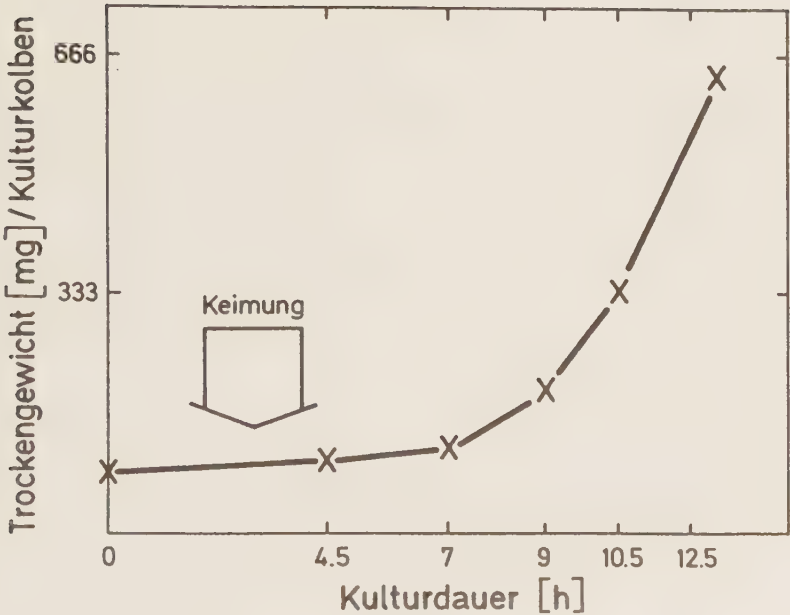


Abb.6:

Zunahme des Trockengewichts bei der *rib-2*-Mutante in Abhängigkeit von der Kulturdauer

b) Kompetenz zur lichtinduzierten Carotinoidsynthese

Auch bei der *rib-2*-Mutante wurden sowohl die Sporen, wie auch unterschiedlich altes Myzel auf die Kompetenz für die lichtabhängige Carotinoidsynthese getestet (Methode vgl. Kap. B)I.2.). Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt und zeigen, daß der Verlauf der Kompetenz-Entstehung der *rib-2*-Mutante dem des Wildstammes gleicht, also ein Myzel im Alter von 9 Stunden noch nicht kompetent ist, hingegen nach einer Kultur-Dauer von 9,25 Stunden eindeutig Kompetenz zeigt.

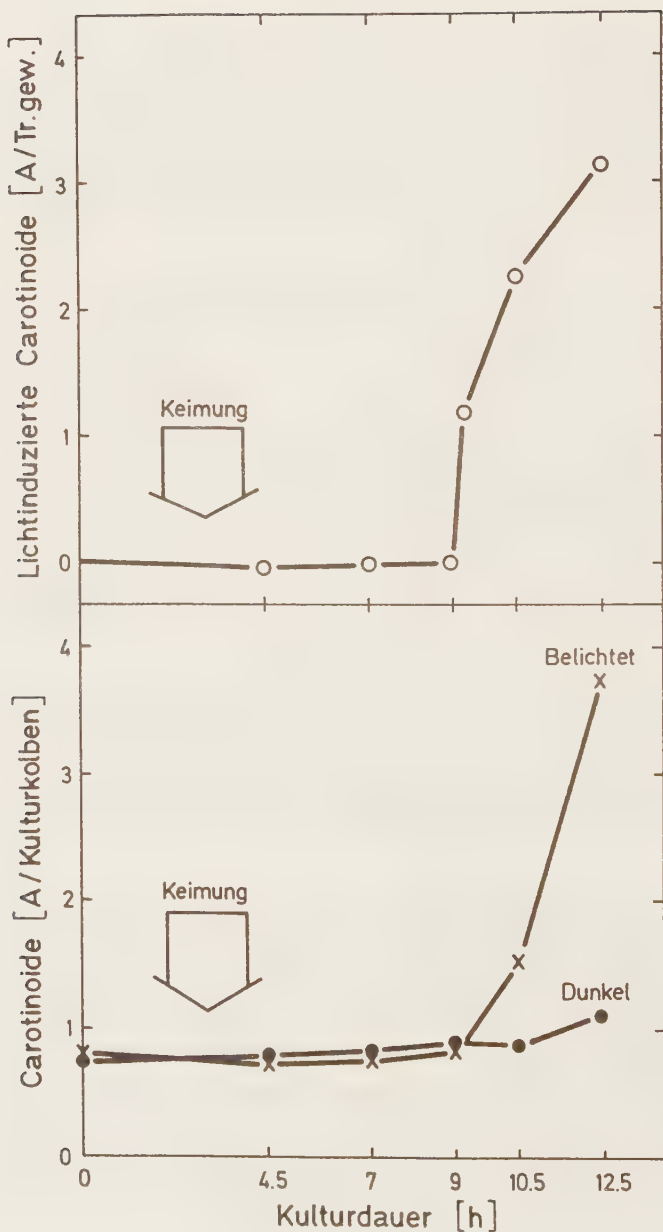


Abb.7:

Verlauf der Kompetenz-Entstehung für die lichtabhängige Carotinoid-synthese bei der rib-2-Mutante (zwei verschiedene Darstellungsweisen)

II. Akkomodation

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, handelt es sich bei der Akkomodation um eine verstärkte Fähigkeit zur Carotinoidbiosynthese nach step-down-Bedingungen (Schrott, 1980). Außerdem kann, wie der Einleitung zu entnehmen ist, die Akkomodation dazu dienen, einen Zusammenhang zwischen Veränderungen im Flavoproteinmuster und dem Photorezeptorsystem bzw. der Signalkette herzustellen. Das Ausmaß dieser durch Akkomodation gesteigerten Synthesefähigkeit wurde deshalb beim Wildstamm und der rib-2-Mutante vergleichend untersucht.

1.) Material und Methode

Um die Akkomodation bei verschiedenen altem Myzel zu untersuchen, wurden (vgl. Kap. A)I und Kap. B)I.2) verschieden alte Pilzsuspensionen gewonnen; diese wurden in Dunkelkontrollen und zu belichtende Proben aufgeteilt. Bei den zu belichtenden Proben wurde ein Teil 2 Stunden im Minimalmedium mit Luft durchströmt bevor belichtet wurde ("Akkomodierte Proben"); der andere Teil wurde sofort nach Überführung der Pilzsuspension vom Vollmedium ins Minimalmedium belichtet ("Nicht akkomodierte Proben").

2.) Akkomodation beim Wildstamm

Beim Wildstamm wurde geprüft, ob das Phänomen der Akkomodation bzw. dessen Ausprägung von der Kulturdauer abhängig ist. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 zusammengefaßt und zeigen eine Steigerung der Carotinoidbiosynthese bei allen Altersstufen des kompetenten Myzels durch Akkomodation. Je nach Kulturdauer betrug diese die 3-4 fache Menge der Carotinoide ohne step-down-Bedingungen. Die Ausprägung der Akkomodation war also von der Kulturdauer relativ unabhängig.

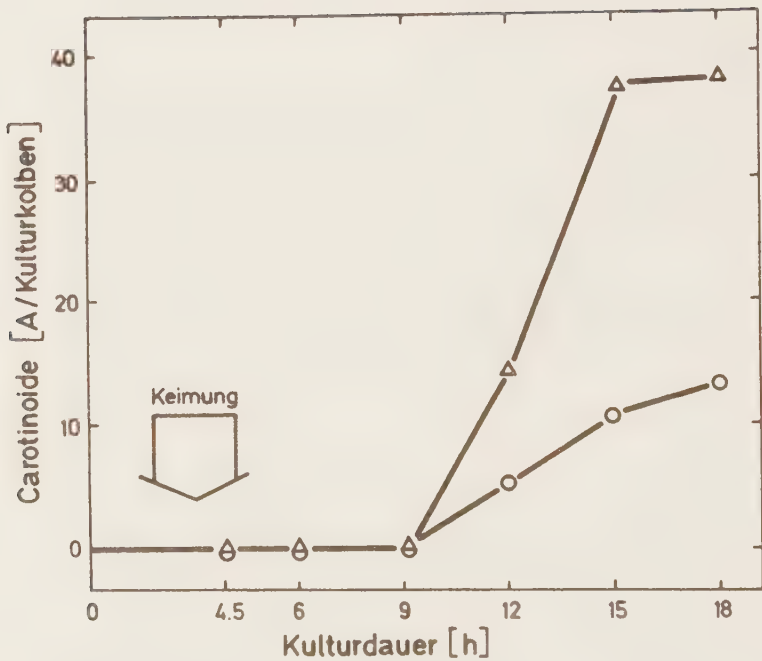


Abb.8:

Carotinoidgehalt belichteter akkomodierter (Δ — Δ) und nicht akkomodierter Proben (o—o)

3.) Akkomodation bei der rib-2-Mutante

Da die rib-2-Mutante für die Untersuchung zum Flavoproteinmuster verwendet wurde (vgl.Kap.C), wurde sie, ebenso wie der Wildstamm, bezüglich des Phänomens der Akkomodation untersucht, allerdings nur bei repräsentativen Myzelaltern. Die Ergebnisse zeigten, daß die Akkomodation bei der rib-2-Mutante sogar noch stärker zum Ausdruck kommt als beim Wildstamm.

Die rib-2-Mutante ist somit auf Grund der Riboflavinaufnahme, der Kompetenz-Entstehung und der Akkomodation für die Untersuchung des Flavoproteinmusters bestens geeignet.

III. Versuche zum "Gedächtnis" bei der Photoinduktion

Wie bereits detaillierter in der Einleitung beschrieben, ist bei *Sinapis alba* (Steinitz et al., 1976), wie auch bei *Fusarium aquaeductuum* und *Neurospora* (Rau 1971, Rau und Rau-Hund 1977), die Fähigkeit des Organismus beschrieben, sich einen Lichtreiz bei entweder nicht vorhandener Kompetenz oder bei Blockierung der Pigmentsynthese zu "merken" und erst bei späterer Erlangung der Fähigkeit zur Farbstoffbildung die lichtinduzierte Reaktion zu zeigen.

Es sollte nun geprüft werden, ob man bei *Neurospora crassa* nicht-kompetentes Myzel einer Lichtinduktion aussetzen und bei anschließendem Wachstum bis zu einem kompetenten Stadium eine lichtinduzierte Carotinoidbiosynthese beobachten kann.

1.) Material und Methode

Die verschiedenen Versuchsbedingungen sind in Abb.9 schematisch dargestellt, dabei bedeutet (a) jeweils die belichtete Probe, (b) die Dunkelkontrolle. Damit bei gleicher Dichte der Myzelsuspension belichtet werden konnte, wurde die Menge der Sporensuspension beim Animpfen entsprechend gewählt. Es wurde vorher festgestellt, daß diese Variation an der Kompetenz-Entstehung, wie auch am mikroskopischen Bild des Myzels unterschiedlicher Kulturdauer nichts änderte.

Beim Versuchsansatz "B" wurde Myzelsuspension nach 8 Stunden langem Wachstum (also im nicht-kompetenten Zustand) auf Waschflaschen verteilt, 4 Minuten lang mit Sauerstoff durchströmt und belichtet (vgl. Kap. A)II); dann wurde die Suspension wieder in einen Kulturkolben

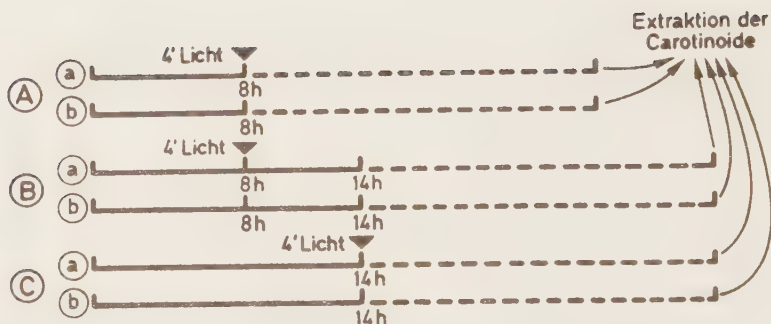


Abb.9:

Schema der experimentellen Bedingungen. |—| Aufenthalt des Myzels im Vollmedium. |---| Aufenthalt des Myzels im Minimalmedium.

zusammengeschüttet und weiter bis zum Alter von 14 Stunden wachsen gelassen. Anschließend wurde dann die Pilzsuspension ins Minimalmedium übergeführt und nach weiteren 18 Stunden Nachreaktionszeit erfolgte die Extraktion der Carotinoide. Die Dunkelkontrolle wurde, abgesehen von der Belichtung, identisch behandelt. Andere aus der gleichen Sporensuspension angeimpfte Kulturkolben dienten als Kontrollen (vgl. Abb.9, Versuchsansatz "A" und "C"). Dabei wurde wie aus Abb.9, Versuchsansatz "A" zu sehen, 8 Stunden altes Myzel auf Waschflaschen verteilt; ein Teil davon wurde 4 Minuten lang belichtet, der andere Teil diente als Dunkelkontrolle.

Entsprechend wurde auch das Mycel der 14 Stunden-Kontrolle (Abb.9, Versuchsansatz "C") aufgeteilt. Die Pilzsuspension beider Kontrollen wurde sofort nach Belichtung bzw. dem Sauerstoffdurchstrom der Dunkelproben ins Minimalmedium übergeführt und 18 Stunden lang zur Nachreaktion belassen. Die Pilzsuspensionen der Kontrollen konnten somit nach der Belichtung nicht mehr weiterwachsen. Um die in Abb. 9, Versuchsansatz "B" dargestellten Versuchsbedingungen exakt einzuhalten, wurden die Versuchsansätze "A" und "C" im Vollmedium belichtet.

2.) Ergebnisse

Die Ergebnisse für den Wildstamm und die rib-2-Mutante sind in Tab.2 zusammengestellt.

Tab.2: Carotinoidgehalt der in Abb.9 charakterisierten Proben von Wildstamm und rib-2-Mutante

		"A" 8 h-Kontrolle	"B" 8 h-Proben, die bis 14 h weiterwachsen	"C" 14 h-Kontrolle
Carotinoidgehalt der Lichtwerte in % der Dunkelwerte	Wildstamm	98	99	175
	rib-2-Mutante	101	100	196

Wie daraus zu ersehen ist, wird bei der 8-Stunden-Kontrolle, wie auch bei 8 Stunden altem Myzel, das bis zum Alter von 14 Stunden weitergewachsen ist, durch Licht keine zusätzliche Carotinoidsynthese induziert. Im Gegensatz dazu steht die lichtinduzierte Farbstoffmenge des kompetenten 14 Stunden alten Myzels von zusätzlich 75 Prozent beim Wildstamm bzw. 96 Prozent bei der rib-2-Mutante.

Daraus läßt sich schließen, daß sowohl die rib-2-Mutante, als auch der Wildstamm im Hinblick auf eine Photoinduktion während der Kompetenz-Entstehung kein "Gedächtnis" (memory-effect) zeigen.

C) Untersuchungen zum Flavoproteinemuster im Zusammenhang mit der Lichtinduktion

I. Voraussetzungen

1.) Die Wahl der Markierung

Um Veränderungen im Flavoproteinemuster feststellen zu können, müssen Flavoproteine spezifisch markiert werden, um sie von den anderen Proteinen unterscheiden zu können. Dies ist nur durch einen Einbau von radioaktiv markiertem Riboflavin möglich, durch den zwar der Flavinanteil, nicht jedoch der Proteinanteil markiert ist.

Eine solche Markierung birgt jedoch gewisse Probleme in sich. Zum einen ist die spezifische Aktivität von käuflichem ^{14}C -Riboflavin um den Faktor 1:20 000 geringer als die von ^{35}S -Methionin, mit dem üblicherweise Proteine markiert werden. Die unterschiedliche Halbwertszeit dieser Nuklide und damit die Zahl der Zerfälle pro Zeiteinheit (cpm/min) geht selbst dann in die Berechnung mit einem Faktor von 1:16 000 ein, wenn man die Auflegezeit des Gels auf den Röntgenfilm auf das Doppelte erhöht. Dazu kommt noch, daß 4-10 Methionine in eine Polypeptidkette eingebaut werden, wogegen meist nur ein Molekül Riboflavin in ein Flavoprotein eingebaut wird.

Eine überschlägige Kalkulation aller dieser Fakten läßt erwarten, daß eine radioaktive Markierung mit ^{14}C -Riboflavin um einen Faktor von 1:10 000 schlechter ist als eine entsprechende mit ^{35}S -Methionin.

2.) Überlegungen und Vorversuche zur Auftrennung von Flavoproteinen

Um das erläuterte Problem der niedrigen spezifischen Aktivität experimentell zu lösen, wurden die sonst üblichen in vivo-Pulsmarkierungen, bei denen der Nährlösung zu einem bestimmten Zeitpunkt radioaktiv markierte Substanz zugegeben wird, wie folgt abgewandelt:

Es wurde die Nährlösung, die bei einer Pulsmarkierung bis zum gewünschten Zeitpunkt "kaltes" - also nicht radioaktiv markiertes - Riboflavin enthielt, mit Hilfe einer nicht ribo flavinhaltigen frischen Nährlösung ausgewaschen. Damit wurde zweierlei erreicht: Zum einen wurde das "kalte" Riboflavin entfernt, was ermöglichte, daß ^{14}C -markiertes Riboflavin nicht durch "kaltes" Riboflavin verdünnt wird; zum anderen wurde durch das Auswaschen mit Nährlösung ein evt. osmotischer Schock des Myzels vermieden. Dies war deshalb von Bedeutung, weil das Myzel auf diese Weise ungestört weiterwachsen konnte. Das Myzel wurde danach in eine Nährlösung übergeführt, die nur "heißes" Riboflavin enthielt, aber die Nährstoffzusammensetzung entsprechendere Kulturdauer hatte. Diesem Nährboden wurde "heißes" Riboflavin zugesetzt, damit es in ausreichendem Maße für die Markierung zur Verfügung stand.

Bei der Ausarbeitung der Methodik zur Extraktion wie auch zum Auftrennen von Flavoproteinen wurde versucht, alle Schritte zu vermeiden, die eine Denaturierung bewirken und sie damit so quantitativ als möglich zu erfassen.

Um eine Abspaltung des kovalent oder durch polare Wechselwirkungen gebundenen Riboflavins zu vermeiden, wurden bei der Extraktion der Proteine folgende schonende Bedingungen gewählt:

Eine Denaturierung resuspendierter Proteinfractionen sollte bei der Aufbewahrung solcher Proteinfractionen dadurch vermieden werden, daß diese nicht eingefroren, sondern im Eisbad kühlgestellt wurden.

Eine Ultraschallbehandlung, die üblicherweise zur Desintegration von Membranen verwendet wird, wurde nicht angewendet, weil sie auch auf Flavoproteine denaturierend wirken könnte.

Die Solubilisierung von Membranproteinen erfolgte daher ausschließlich mit einer Kombination des schonenden Detergenz CHAPS (Hjelmland, 1980) und Kaliumchlorid. Die gewählten Konzentrationen (ausgearbeitet von Frau E.Seigner, unveröffentlicht) von 150m Mol Kaliumchlorid und 100m Mol CHAPS sollten schonend, aber effektiv sowohl integrale, wie auch periphere Membranproteine solubilisieren.

Die gängige Verfahrensweise, solubilisierete Fraktionen vor dem Auftragen auf das Elektrophorese-Gel zu fällen und in einen anderen Puffer für die Elektrophorese überzuführen, wurde nicht ausgeführt; hierbei besteht nämlich die Möglichkeit, daß einige Proteine bei der Fällung nicht erfaßt oder aber denaturiert werden.

Schließlich wurde zur Auftrennung der Flavoproteine auch nicht die sonst übliche nur unter denaturierenden Bedingungen ablaufende SDS-Elektrophorese gewählt, sondern sogenannte "native" Gele. Das zum Solubilisieren gewählte CHAPS störte bei der "nativen" Gelelektrophorese nicht, weil es auf Grund seiner zwitter ionischen Eigenschaften den Proteinen ermöglicht entsprechend ihrer Eigenladung zu laufen, eine Grundvoraussetzung, die für native Gele erfüllt sein muß.

Orientierende Experimente zeigten, daß bei einer Fixierung der Proteine im Gel mit Säure keine Radioaktivität mit Hilfe der Autoradiographie nachzuweisen war; deshalb erfolgte die Fixierung der Proteine im Gel durch Hitze.

Die 2,5-Diphenyl-oxazol (PPO-) Einlagerungen zur Verstärkung der Radioaktivität (Bonner und Laskey, 1974) erwies sich ebenfalls als ungünstig, weil Dimethylsulfoxid (DMSO) als Entwässerungsmittel ohne Säurefixierung nicht ausreichte, um scharfe Banden zu fixieren. Es erschienen nach Auflegen eines Films auf das getrocknete Gel nach PPO-Einlagerung keine oder nur noch verschwommene, aber keinesfalls verstärkte Banden. Auch Verstärkerfolien brachten keinen positiven Effekt, weil bei so langen Auflegezeiten der Background zu stark angehoben wurde.

Da der Photoreceptor wahrscheinlich in Membranen lokalisiert ist (vgl. Einleitung), bestand eine weitere experimentelle Überlegung darin, ob man nur die Membranfraktion elektrophoretisch auftrennen sollte. Um jedoch Veränderungen im Flavoproteinmuster, die nur in der Membranfraktion stattfinden, von solchen unterscheiden zu können, die auch in den anderen Zellfraktionen zu beobachten sind, wurde sowohl die Mitochondrienfraktion wie auch die lösliche Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt. Als Voraus-

setzung dafür wurde elektronenmikroskopisch geprüft, ob die Membranfraktion, wie auch die Mitochondrienfraktion unter den gewählten Bedingungen solubilisiert worden ist (Beyer et al., 1985). Da der Nachweis für die Solubilisierung der Membranfraktion bereits erbracht wurde (elektronenmikroskopische Bilder von Herrn Dr. Wanner für Frau E. Seigner, unveröffentlicht), sind im folgenden nur die elektronenmikroskopischen Bilder der Mitochondrien vor und nach der Solubilisierung dargestellt (Vgl. Abb.10 und Abb.11).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen klar, daß nach Zentrifugation mit 13 000 g die Mitochondrien bzw. ihre Membranen gut erhalten sind (vgl. Abb.10). Die Mitochondrien von *Neurospora crassa* können nicht intakt isoliert werden, weil sie ein sehr stark verzweigtes mitochondriales Retikulum bilden, das während der Homogenisation in ca. 2 µm große Fragmente zerlegt wird (Dr. Wanner, persönliche Mitteilung). Nach der Solubilisierung hat sich die Zusammensetzung der Fraktion sichtbar verändert. Die Membranen sind vollständig verschwunden. Nur die zahlreich vorhandenen Glykogenpartikel zeigen, daß es sich noch um die ursprüngliche Mitochondrienfraktion handelt (S.Abb.11).

Abb.10:

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Mitochondrienfraktion vor der Solubilisierung (Negativ-Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure): Sie besteht überwiegend aus Mitochondrienfragmenten (A,B). Die innere Mitochondrienmembran ist eindeutig durch die ATP-ase (Oxisomen) charakterisiert (Pfeile). Typisch für *Neurospora crassa* sind Glykogenpartikel (Kreuzchen) (Wanner, unveröffentlicht)

Abb.11:

Die Mitochondrienfraktion nach der Solubilisierung. Die Mitochondrienmembranen sind vollständig aufgelöst. Nur noch die Glykogenpartikel sind sichtbar (Kreuzchen) (Wanner, unveröffentlicht)



Abb.10

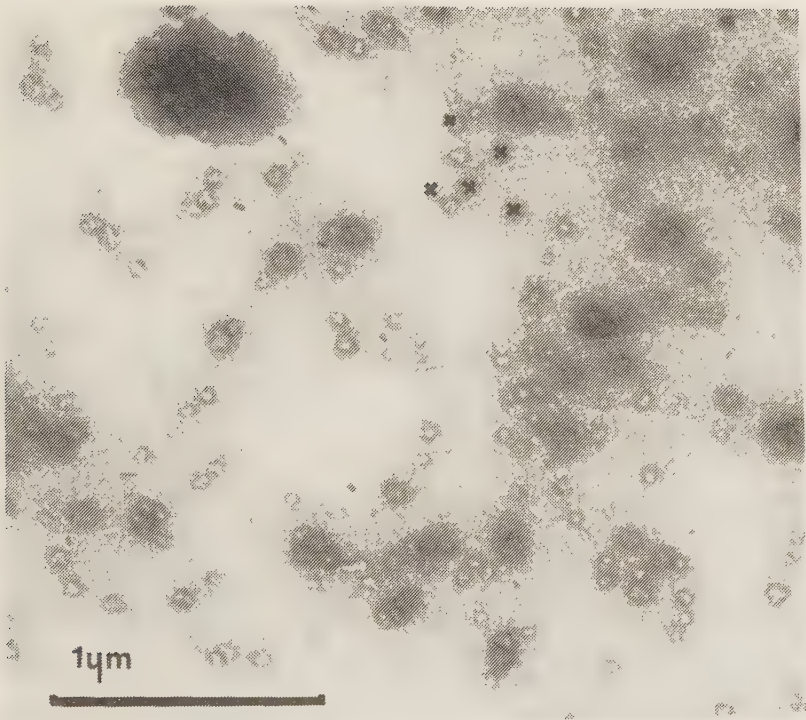


Abb.11

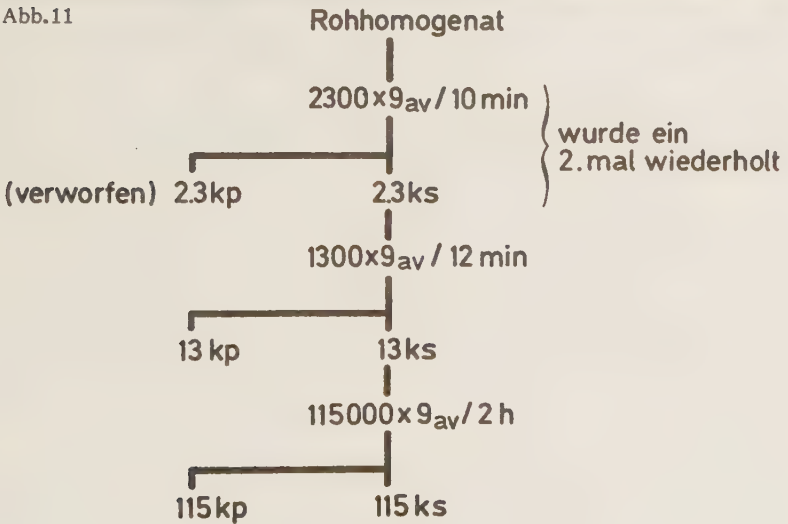


Abb.12:

Schema für die differentielle Zentrifugation des Rohextraktes von *Neurospora crassa* (av = average, gemessen bei durchschnittlicher Mitte der Gesamtsuspensionshöhe)

3.) Material und Methode

Aufgrund dieser Überlegungen (vgl. Kap. C)I.2.) wurde folgende Arbeitsweise gewählt:

a) Versuchsdurchführung

Entsprechend der in Kap. A)II beschriebenen Methode erfolgte die Anzucht des zum Versuch verwendeten Myzels. Alle weiterhin beschriebenen Vorgänge wurden bei Sicherheitslicht (vgl. Kap.A)II) ausgeführt. Je nach Versuchstyp wurde der Nährlösung beim Animpfen ^{14}C -Riboflavin (5-15 μCi) oder 75 μg "kaltes" Riboflavin zugegeben, das zum Wachstum der Riboflavin-auxotrophen Mutante erforderlich war.

b) Fraktionierung der Zellbestandteile

Nach Erreichen des gewünschten Alters wurde das Myzel abgenutscht und mit 1/2 - 1 l H_2O dest und ca. 30 ml Extraktionspuffer I (0,2 m Tris-HCl-Puffer, pH 8 mit 1m Mol PMSF(Sigma) und 2m Mol DTT Dithiothreitol) gespült. Anschließend wurde das Frischgewicht bestimmt und die ca. 1,5-fache Menge in Milliliter Extraktionspuffer I und das 0,25-fache des Frischgewichts in Gramm an Sand zugegeben. Sodann wurde das Myzel zu einer homogenen Suspension zerrieben. In Abb. 12 ist dargestellt, durch welche Zentrifugations-schritte das Myzel fraktioniert wurde (Mitzka-Schnabel, 1978). Die 2,3 Kp-Fraktion, die Zellkerne und Zellpartikel enthält, wurde verworfen, während die Mitochondrienfraktion (13 Kp), wie auch die Membranfraktion (115 Kp) Plasmamembranen und endoplasmatisches Retikulum mit Extraktionspuffer II (150 m Mol Ka, 50 m Mol Tris-HCl-Puffer, pH 8 mit 1 m Mol PMSF und 2 m Mol DTT) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Potter-Homogenisators resuspendiert wurde. Die Mitochondrien- und die Membranfraktion wie auch die lösliche Fraktion (115 Ks) wurden über Nacht im Eisbad aufbewahrt, nachdem Aliquots zur Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) entnommen wurden.

c) Solubilisierung

Die jeweiligen Fraktionstypen, nämlich die Membranfraktion (8-12 mg/ml), die Mitochondrienfraktion (5-7 mg/ml) und die lösliche Fraktion (1,5-3 mg/ml) wurden auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Sodann wurde der

Membran- und Mitochondrienfraktion soviel CHAPS zugegeben, daß eine Endkonzentration von 100m Mol erreicht wurde. Diese Proben wurden dann 1 Stunde im Eisbad gerührt. Anschließend wurden durch eine 2,5-stündige Zentrifugation bei 120 000 g die solubilisierten von den nicht-solubilisierten Bestandteilen der Membran- und Mitochondrienfraktion getrennt (Beyer et al., 1985).

d) Gel-Elektrophorese

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, erfolgte bei allen Fraktionen (Mitochondrien-, Membran- und lösliche Fraktion) Rnase-Behandlung (ca. 6 µg Ribonuklease pro mg Protein).

Elektrophoretisch (Maurer, 1968) wurden die Proteine mit Hilfe eines Trenngels, das wie folgt zusammengesetzt war, aufgetrennt:

3,020 m Tris-HCl-Puffer pH 8,9 mit 0,32 ml Temed auf 100 ml H₂O bidest :
3,75 ml

Bisacrylamidlösung (28 g Acrylamid (Serva); 0,74 g Bisacrylamid (LKB) in
100 ml H₂O bidest): 7,5 ml

2,94 mg CHAPS (Sigma) mit 3,75 ml H₂O bidest: 3,75 ml

0,14 % Ammoniumpersulfatlösung (LKB): 15 ml

Nach Überschichten des Gels mit Aqua dest. polymerisierte es ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur. Das Wasser wurde danach abgesaugt und ein Sammelgel folgender Zusammensetzung auf das Trenngel pipettiert:

0,494 m Tris-HCl-Puffer, pH 6,7 mit 0,46 ml Temed auf 100 ml H₂O bidest:
1,25 ml

Bisacrylamidlösung (10 g Acrylamid (Serva), 2,5 g Bisacrylamid (LKB) in
100 ml H₂O bidest.): 2,5ml

98 mg CHAPS in 6,25 ml H₂O bidest. : 6,25 ml

10 % Ammoniumpersulfatlösung: 45 µl

Mit einem Teflonkamm (LKB) wurden dabei Auftragsaschen von 7 mm x 18 mm ausgespart.

Zur Kontrolle der Trennqualität und als Orientierungshilfe wurde ein Standardgemisch (Proteintestmixture 4 und 5, Serva) in einer Spur aufgetragen, obwohl dieses nicht wie beim SDS-Gel zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen werden konnte, weil die Proteine in nativen Gelen sowohl nach ihrer Ladung als auch ihrer Größe und Form laufen. Zwischen den Proben wurden Leerspuren mitgeführt, um sicherzustellen, daß sich, soweit es platzmäßig möglich war, Proben nicht miteinander vermischten. Alle Proben wurden mit Kammerpuffer überschichtet und die Elektrophorese gestartet (vertikales Elektrophoresesystem, Firma LKB). Die Kühlung der Kammer-Puffer (0,384 m Glyzin (Serva) und 0,0496 m Tris/HCl pH 8,3) erfolgte mit Hilfe eines Kryostaten, der auf + 1°C thermostatisiert wurde. Der Puffer hatte dadurch eine Temperatur von ca. 4-5°C während des Laufes, der bei 40 mA ca. 16 Stunden für je 2 Gele der beiden Kammern dauerte (Spannungsgerät: Bromna Power Supply, Firma LKB). Nach Beendigung des Laufes wurde meist 1 Gel je Kammer angefärbt und entfärbt, während die Proteinbanden des anderen Gels mit einem vorgeheizten Gelrockner fixiert wurden (Gelrockner Zabonna AG Basel, Heizstufe: High). Angefärbt und entfärbt wurde mit folgenden Lösungen: Färbelösung (2,5 g Commassie Brilliant Blue R-250 in 1 l 96 % Ethanol gelöst; diese Lösung 1:1 vermischt mit 10 % Essigsäure), Entfärber 1 (96 % Ethanol und 5 % Essigsäure 2:3 vermischt), Entfärber 2 (96 % Ethanol und 5 % Essigsäure 1:4 vermischt) und Entfärber 3 (5 % Essigsäure). Die entfärbten Gele wurden in Frischhaltefolien eingeschweißt und im Kühlschrank aufbewahrt bis sie zur Dokumentation fotografiert wurden. Dagegen dienten die getrockneten Gele zur Identifizierung der radioaktiven Banden, die mit Hilfe des Kodak X-OMAT-AR-Films mit ca. 6-8 Wochen Auflegezeit bei -60°C autoradiographiert wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Film mit Kodak-GBX-Chemikalien entwickelt (bei 21°C 5 Minuten lang) und fixiert und nach Wässerung an der Luft getrocknet. Danach wurden die Filme fotografiert.

II. Das Flavoproteinmuster

1.) Das Flavoproteinmuster im kompetenten Myzel

In diesem Kapitel werden die Flavoproteine eines kompetenten 14 Stunden alten Myzels dargestellt, das von der 9. bis 14. Stunde radioaktiv markiert wurde. Dazu wurden sowohl die solubilisierete Membran- und Mitochondrienfraktion, wie auch die lösliche Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt und die Gele autoradiographiert (Abb.13) (Methode vgl. Kap. II.3)

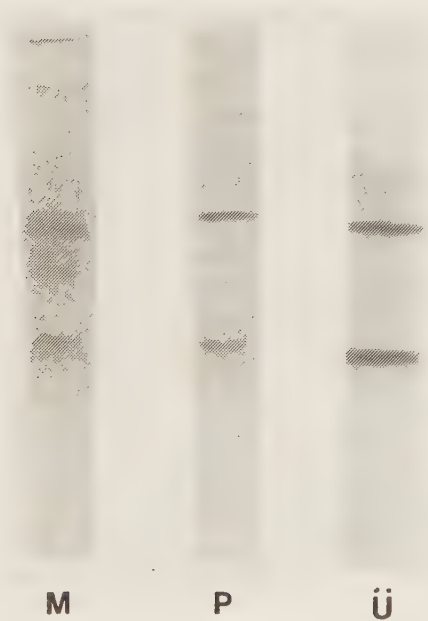


Abb.13:

Die radioaktiven Banden der Membranfraktion "P" (0,269 mg Protein/Spur), der Mitochondrienfraktion "M" (0,223 mg Protein/Spur) und der löslichen Fraktion "Ü" (0,320 mg Protein/Spur).

Wie aus Abb. 13 hervorgeht, sind trotz der niedrigen spezifischen Aktivität von ^{14}C -Riboflavin radioaktiv markierte Proteinbanden deutlich zu erkennen. Die einzelnen Fraktionen unterscheiden sich in ihrem Flavoproteinmuster; es gibt aber auch radioaktiv markierte Proteine, die auf gleicher Höhe mit Proteinbanden einer anderen Fraktion laufen. Dabei kann es sich durchaus um verschiedene Proteine handeln, denn im nativen Gel laufen Proteine gleicher Ladung, obwohl sie verschiedene Größe haben, auf gleicher Höhe im Gel. Andererseits sind es evt. doch gleiche Proteine, die sowohl in der einen als auch in der anderen Fraktion auftreten können. Diese Tatsache kann darin begründet sein, daß sich z.B. in der Membranfraktion auch kleine Mitochondrienmembranstücke befinden, wie auch in der löslichen Fraktion kleinste Bestandteile des endoplasmatischen Retikulums enthalten sein können.

2.) Änderungen während der Entstehung der Kompetenz

Bei den ersten Experimenten mit Pulsmarkierung während der Kompetenz-Entstehung wurden große Intervalle gewählt, weil die spezifische Markierung von Riboflavin sehr niedrig ist. Bei diesem Versuchstyp wurde Myzel zum einen von der 0. bis 9. Stunde, zum anderen von der 9. bis 14. Stunde markiert (vgl. schematische Darstellung in Abb.14).

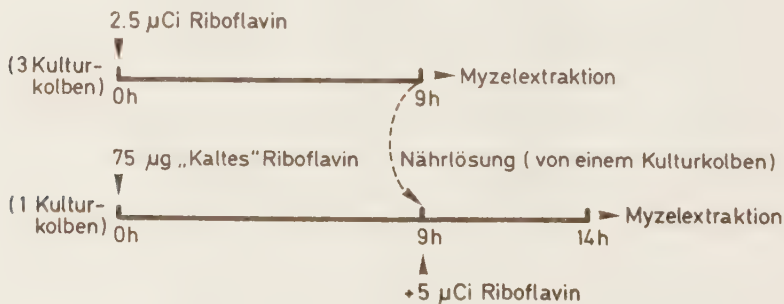


Abb.14:

Schema für Experimente mit Pulsmarkierung

Dazu wurden 4 Kulturkolben beimpft, wobei 3 davon je 2,5 μCi ^{14}C -Riboflavin zugegeben wurde, während ein Kulturkolben 75 μg "kaltes" Riboflavin erhielt. Nach einer Kulturdauer von 9 Stunden wurde das Myzel der 3 Kulturkolben mit ^{14}C -Riboflavin geerntet. Von den 3 verbleibenden Nährlösungen wurden 2 verworfen, während die dritte zum Weiterwachsen des bis dahin mit kaltem Riboflavin gewachsenen Myzels (4. Kulturkolben) diente (vgl. Kap. C)I.2.). Dieser "heißen" Nährlösung wurden 5 μCi Riboflavin für die Pulsmarkierung zugegeben, das schonend abgenutschte Myzel des 4. Kulturkolbens wurde in diese Nährlösung übergeführt und wuchs bis zu einer Kulturdauer von 14 Stunden.

Um sicherzustellen, daß das von der 9. bis 14. Stunde pulsmarkierte Myzel sich nicht von einem in durchgehend "kalter" riboflavinhaltiger Nährlösung unterschied, wurde das Myzel von der 14. Stunde mikroskopiert. Das pulsmarkierte Myzel glich völlig dem nicht pulsmarkiertem. Als Kontrolle, ob bei Experimenten in den jeweilig zu markierenden Intervallen genügend Riboflavin zur Verfügung stand, wurden der Nährlösung beim Animpfen nach der 9. und 14. Stunde Aliquots zur Radioaktivitätsbestimmung entnommen.

Das von der 0. bis 9. Stunde, wie auch das von der 9. bis zur 14. Stunde pulsmarkierte Myzel wurde, wie in Kap. C)I.3. beschrieben, fraktioniert, solubilisiert und die erhaltenen Proben auf Gele aufgetragen. Dabei ergab sich folgendes Bild (Abb.15). Wie aus Abb. 15 hervorgeht, zeigten sich beim Vergleich der solubilisierten Membranfraktionen des von der 0. bis 9. Stunde markierten (P_1) und des von der 9. bis 14. Stunde pulsmarkierten Myzels (P_2) Veränderungen im Flavoproteinstreifenmuster. Betrachtet man die Bande 1 und 2, so kann man von einer überproportionalen Zunahme des Schwärzungsgrades dieser Banden in P_2 gegenüber P_1 sprechen. Bei dieser Auswertung wurde berücksichtigt, daß zwar die gleichen Proteinmengen bei den zu vergleichenden Membranfraktionen auf das Gel aufgetragen wurden, jedoch nur ungefähr die gleiche Menge an Radioaktivität. Deshalb mußten wenn möglich mehrere andere radioaktive Banden, die beim Vergleich von P_1 und P_2 in ihrem Schwärzungsgrad konstant geblieben sind in Relation zu den betrachteten Banden 1 und 2 gesetzt werden. Erst

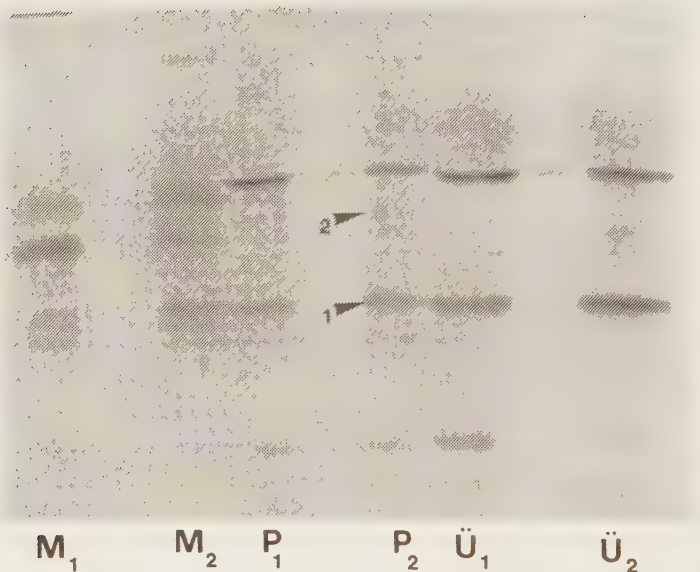


Abb.15:

Die radioaktiven Banden der Membranfraktion "P" (P₁ und P₂: jeweils 0,269 mg Protein/Spur), der Mitochondrienfraktion "M" (M₁² und M₂: jeweils 0,223 mg Protein/Spur) und der löslichen Fraktion "Ü" (Ü₁ und Ü₂: jeweils 0,320 mg Protein/Spur). Die Indizes kennzeichnen das Markierungsintervall 1: 0-9 Stunden, 2: 9-14 Stunden.

dann kann man von einer überproportionalen Zunahme sprechen. Ein Argument gegen diese Art der Auswertung wäre, daß es sich bei den in ihrem Schwärzungsgrad konstant gebliebenen Banden um Flavoproteine handelt, die in ihrer Konzentration abgenommen haben. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, daß dies bei mehreren Banden gleichzeitig der Fall ist.

Weiterhin könnte eingewendet werden, daß es sich bei den radioaktiven Banden nicht um Flavoproteine handelt, sondern um Abbauprodukte des an einem C-Atom markierten Riboflavin. Folgende Tatsachen sprechen jedoch für Flavoproteine:

Wie bereits in Kap. C)I.2. beschrieben, verschwindet bei Säurefixierung die Radioaktivität aller Banden. Offensichtlich sind also die Bindungen, mit denen das radioaktiv markierte Molekül an die Proteine gebunden ist relativ ähnlich, zumindest säureanfällig, was sowohl bei Kovalenten, wie auch bei durch polare Wechselwirkung gebundenem Flavin an das Protein möglich ist. Bei kleineren Abbauprodukten wäre aufgrund daraus resultierender unterschiedlichster Bindungstypen eine einheitliche Säurelabilität unwahrscheinlicher.

Außerdem sind keineswegs alle stärker angefärbten Proteinbanden auch radioaktiv. Je kleiner und somit unspezifischer ein Abbauprodukt von Riboflavin wäre, umso eher könnte man die Verknüpfung der radioaktiven Abbauprodukte mit fast jedem Protein erwarten.

Die beiden eben diskutierten Sachverhalte sprechen zwar gegen ein Abbauprodukt von radioaktiv markiertem Riboflavin, unwiderlegbar bewiesen ist dies jedoch durch die vorliegenden Untersuchungen nicht.

Bei dem zuletzt beschriebenen Experiment (vgl. Abb.15) wurde das Intervall von der 0. bis 9. Stunde, also nicht kompetentes Myzel, und das Intervall von der 9. bis 14. Stunde, also Myzel während der Kompetenz-Entwicklung, mit ^{14}C -Riboflavin markiert.

Um nun Veränderungen im Flavoproteinmuster genauer mit der Kompetenz-Entstehung vergleichen zu können, wurden mehrere kürzere Markierungen durchgeführt.

Als Markierungsintervalle wurden solche von der 0. bis 7. und der 7. bis 9. Stunde Kulturdauer im nicht-kompetenten Zustand und von der 9. bis

10,5. Stunde im kompetenten Zustand gewählt. Prinzipiell wurden diese Experimente ebenfalls so durchgeführt wie in Abb. 14 schematisch dargestellt. Anzumerken wäre bei diesen Versuchen nur, daß die Markierung von der 0. bis 7. Stunde dadurch ermöglicht wurde, daß Konidien von auf "heißem" Testnährboden gewachsenem Myzel ($0,5 \mu\text{Ci}/\text{Testnährbodenkölbchen}$) zum Animpfen verwendet wurden. Dies wurde deshalb gemacht, weil die Zunahme des Trockengewichts innerhalb des Intervalls von 0-7 Stunden sehr gering ist (vgl. Kap.B)I.3.), d.h. daß für Biosynthesen des auskeimenden Myzels die in den Konidien bereits vorhandenen Substanzen zur Verfügung stehen. Somit wurde experimentell ermöglicht, auch Flavoproteine dieses Intervalls mit Hilfe der Autoradiographie zu erfassen. In Abb.16 sind die Membranfraktionen der von der 0. bis 7. Stunde, der 7. bis 9. Stunde und der 9. bis 10.5 Stunde markierten Myzelien dargestellt.

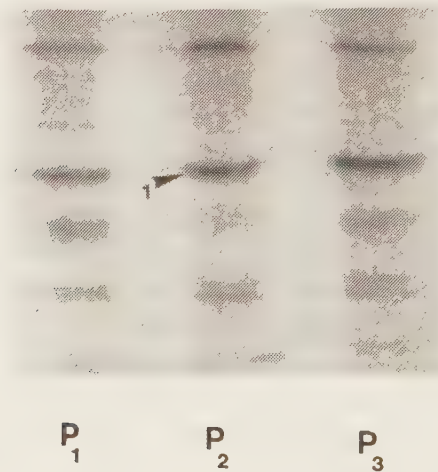


Abb.16:

Die radioaktiven Banden der Membranfraktion "P" (P_1 , P_2 und P_3 : jeweils $0,383 \text{ mg Protein/Spur}$). Die Indizes kennzeichnen das P_1 P_2 P_3 Märkierungsintervall: 1: 0-7 Stunden; 2: 7-9 Stunden; 3: 9-10,5 Stunden.

Es läßt sich eine überproportionale Zunahme des Schwärzungsgrades der Bande 1 (vgl. Versuch in Abb.15) beobachten. Die Schwärzung der Bande 2 war bei so kurzen Intervallen zu schwach um Veränderungen im "Schwärzungsgrad" feststellen zu können. Veränderungen der Schwärzungsgrade bzw. die Neubildung anderer Flavoproteine waren nicht reproduzierbar.

Es läßt sich somit sowohl beim Experiment mit den Markierungsintervallen von der 0. bis 9. und der 9. bis 14. Stunde, wie auch beim Experiment mit Intervallen von der 0. bis 7., 7. bis 9. und 9. bis 10.5. Stunde eine überproportionale Zunahme des Schwärzungsgrades von Bande 1 beobachten. Der Schwärzungsgrad von Bande 2 läßt sich nur beim Markierungsexperiment mit größeren Intervallen beurteilen.

3.) Änderungen bei der Akkomodation

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei der Akkomodation um die vermehrte lichtinduzierte Carotinoidbildung nach Aufenthalt des Myzels im Minimalmedium. Der Grund für dieses Phänomen könnte evt. in einer vermehrten Bildung von Photoreceptor oder in einer Verstärkung der Signalkette liegen. Treten die selben Veränderungen im Flavoproteinmuster sowohl bei der Kompetenz-Entstehung, als auch bei der Akkomodation auf, so können diese weder im Zusammenhang mit dem exponentiellen Wachstum noch allein mit dem Aufenthalt im Minimalmedium stehen. Denn wie bereits in der Einleitung erwähnt, tritt die Kompetenz-Entstehung während der exponentiellen Wachstumsphase auf, hingegen die verstärkte lichtinduzierte Carotinoidbildung nach 2 Stunden Aufenthalt des Myzels im Minimalmedium. Experimentell konnten nach diesen 2 Stunden weder Veränderungen im Trockengewicht, noch beim Mikroskopieren des Myzels beobachtet werden.

Für die Versuche wurden 2 Kulturkolben mit der gleichen Sporensuspension beimpft, wobei einem Kulturkolben 7,5 μCi ^{14}C -Riboflavin, dem anderen 75 μg "kaltes" Riboflavin zugegeben wurde. Nach 19 Stunden wurden beide Myzelien geerntet und die Membranen des durchgehend 19 Stunden lang heiß markierten Myzels extrahiert (vgl.Kap.C)I.3.). Das mit "kaltem"

Riboflavin gewachsene Myzel wurde in Waschflaschen mit Minimalmedium übergeführt, wobei das "kalte" Riboflavin durch gründliches Waschen entfernt wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von $1,5 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Riboflavin pro Waschflasche. Dadurch sollte in der anschließenden Markierungsperiode während der Akkomodation die Aufnahme von möglichst viel "heißem" Riboflavin gewährleistet sein und der eingebaute Anteil von "kaltem" Riboflavin auf ein Minimum beschränkt werden. Nach 2 Stunden Inkubation wurde auch dieses Myzel extrahiert (vgl. Kap. C) I. 3.). Die Membran-, Mitochondrien- und lösliche Fraktion des von der 0. bis 19. Stunde und des während der zweistündigen Akkomodation mit ^{14}C -Riboflavin markierten Myzels ist in Abb. 17 dargestellt.

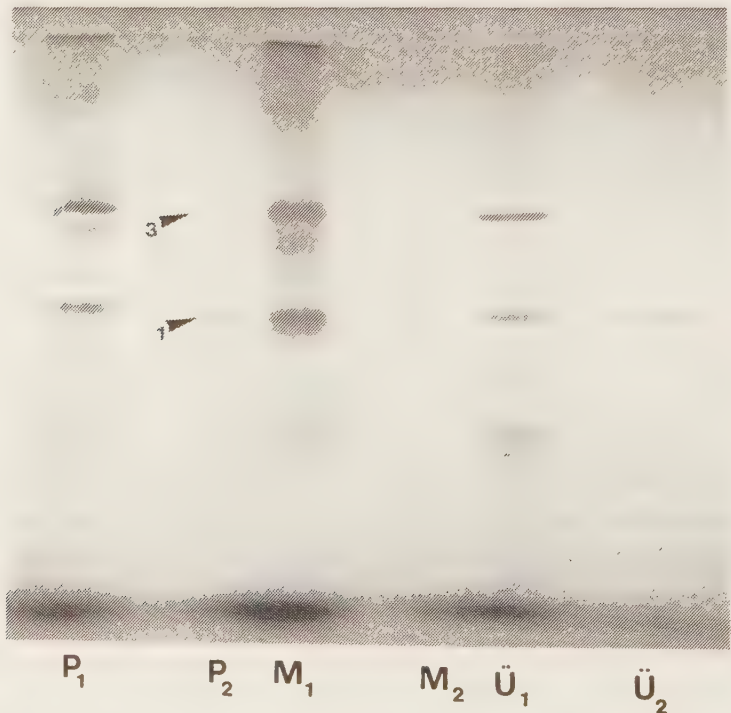


Abb. 17:

Die radioaktiven Banden der Membranfraktion "P" (P_1 und P_2 : jeweils 0,503 mg Protein/Spur), der Mitochondrienmembran "M" (M_1 und M_2 : jeweils 0,180 mg Protein/Spur) und der löslichen Fraktion "Ü" ($Ü_1$ und $Ü_2$: jeweils 0,320 mg Protein/Spur). Die Indizes kennzeichnen das Markierungsintervall: 1: 0-19 Stunden, 2: 2 Stunden Akkomodation. "F" bezeichnet die Front bei der Gel-Elektrophorese. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um nicht eingebautes Riboflavin, was beim getrockneten Gel eine gelbe, beim Film eine schwarze Front ergibt.

Wie daraus zu ersehen ist, kann man 2 radioaktive Banden deutlich bei der zweistündigen Pulsmarkierung während der Akkomodation beobachten. Betrachtet man die Schwärzung der Bande 3, setzt diese in Relation zur Schwärzung der Bande 3 des 0-19 Stunden markierten Myzels und geht entsprechend bei der Schwärzung der Bande 1 vor, so ergibt sich eine überproportionale Zunahme der Schwärzung von Bande 1 gegenüber Bande 3. Die Schwärzung von Bande 2 kann auch bei diesem Experiment (vgl. Experiment von Abb.16) nicht beurteilt werden, weil die Aufnahme während der 2 Stunden langen Akkomodation zu schwach ist.

Es läßt sich also feststellen, daß sowohl bei Markierungsexperimenten während der Kompetenz-Entstehung, wie auch während der Akkomodation eine überproportionale Zunahme der Schwärzung von Bande 1 gegeben ist. Da dies bei beiden Phänomenen der Fall ist, wird ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der Konzentration dieses Flavoproteins und dem Photoreceptor bzw. der Signalkette wahrscheinlicher. Die Bande 3 kann sowohl mit dem Stoffwechsel im Minimalmedium, wie auch mit dem Photoreceptor bzw. der Signalkette in Zusammenhang stehen.

III. Kurzfristige Auswirkungen einer Belichtung auf das Protein- und Flavoproteinmuster von Membranen

1.) Veränderungen der Membranzusammensetzung

Bei Untersuchungen an *Phycomyces* wurde festgestellt, daß bei Experimenten mit kurzzeitigen Blaubeleuchtungen ein Flavoprotein gegenüber der Dunkelkontrolle verstärkt auftritt (Pollock et al., 1985). Deshalb wurde auch bei *Neurospora crassa* untersucht, ob man beim Protein- bzw. Flavoproteinmuster Veränderungen bei kurzen Belichtungszeiten beobachten kann. Eine allgemeine Voraussetzung war die Wahl einer optimal kurzen Belichtungszeit. Einerseits sollten Sekundärreaktionen wie die Proteinbiosynthese möglichst ausgeschlossen werden um Primärreaktionen, die sich beim Photoreceptor bzw. in der Signalkette abspielen, beobachten zu können.

Andererseits sollten genügend Photoreceptormoleküle auf Licht in der gewählten Zeit reagiert haben, um zu ermöglichen, die durch niedrige Konzentration von Photoreceptormolekülen (Gressel und Rau, 1983) bedingte Primärreaktion experimentell zu erfassen. Die Sättigung der Induktion der Carotinoidbiosynthese bei *Neurospora crassa* von der 1. bis 16. Minute Belichtungszeit wird dahingehend interpretiert, daß alle zur Verfügung stehenden Photoreceptormoleküle bis zu 1 Minute nach Belichtungsbeginn reagiert haben. Eine Regeneration dieser Moleküle von der 1. bis 16. Minute soll erforderlich sein, um eine weitere Induktion der Carotinoidbiosynthese zu ermöglichen (Schrott, 1981). Von dieser Arbeitshypothese ausgehend wurde eine Belichtungszeit von 1 Minute gewählt.

Der Versuch wurde folgendermaßen ausgeführt. Das Myzel zweier mit 7,5 μCi ^{14}C -Riboflavin markierter Kulturkolben wurde geerntet. Die gewonnene Pilzsuspension wurde auf Waschflaschen, die Minimalmedium enthielten, verteilt. Zwei Drittel dieser Waschflaschen wurden belichtet, wobei der Stoffwechsel eines Drittels der Proben sofort nach Belichtung durch flüssigen Stickstoff zum Erliegen gebracht wurde (P_2). Das Myzel dieses Drittels wurde in kleine Stücke zerschlagen und mit heißem Extraktionspuffer I (100°C) versetzt. Ein anderes belichtetes Drittel wurde wie bei allen Experimenten (vgl. Kap. C) I. 3.) extrahiert (P_3). Das letzte Drittel diente als Dunkelkontrolle (P_1).

Das sofortige Unterbinden aller weiteren Reaktionen eines Teils der belichteten Proben erfolgte deshalb mit flüssigem Stickstoff, weil man nur bei dieser Methode sicher sein kann, daß genau nach 1 Minute Belichtung und weiteren 3 Minuten, die man zur Überführung des Myzels in flüssigen Stickstoff braucht, die durch Licht ausgelöste Reaktion gestoppt wird. Diese Variation bei der Extraktion des Myzels stellte eine experimentelle Voraussetzung dar, um möglichst nur Primärreaktionen zu erfassen. Die belichtete Probe, die unter den sonst in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen extrahiert wurde, stellte eine Kontrolle dar.

Denn erst wenn sich die Proteinbanden beider verschieden behandelter belichteter Proben in ihrem Muster völlig gleichen, kann man Artefakte, die auf die Extraktion mit flüssigem Stickstoff zurückzuführen sein könnten, ausschließen. - In Abb. 18 sind die solubilisierten Membranfraktionen der Dunkelkontrolle, wie auch der belichteten Proben, dargestellt.

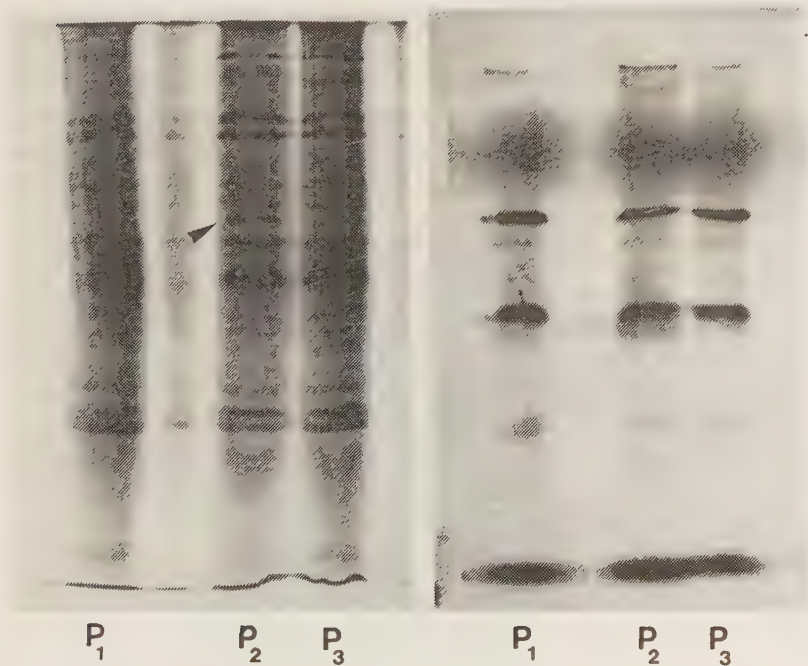


Abb.18:

Proteinbanden des angefärbten Gels (linker Teil) und die dazugehörigen radioaktiven Banden (rechter Teil) von Membranfraktionen "P" (P_1 , P_2 und P_3 : jeweils 0,417 mg Protein/Spur). Index 1 kennzeichnet die Dunkelkontrolle, Index 2 und 3 die belichteten Proben.

Vergleicht man die beiden belichteten Proben mit den Dunkelproben des mit Commassie Blue angefärbten Gels, so zeigt sich, daß eine Proteinbande der belichteten Proben gegenüber der Dunkelkontrolle deutlich

verstärkt ist. Dagegen ließ sich weder bei der Mitochondrienfraktion noch bei der löslichen Fraktion eine durch Belichtung hervorgerufene Veränderung beobachten. Es handelte sich also um eine spezifisch in der Membranfraktion bei kurzer Belichtung verstärkt auftretende Proteinbande.

Andererseits kann man auf radioaktiver Ebene (vgl. Abb. 18) auch bei der Membranfraktion keine Veränderung einer Bande bei Belichtung feststellen.

Trennt man die solubilisierten Membranfraktionen der Dunkelkontrolle und der belichteten Proben einen Tag nach erfolgter Solubilisierung auf, erhält man folgendes Proteinbandenmuster (Abb. 19).

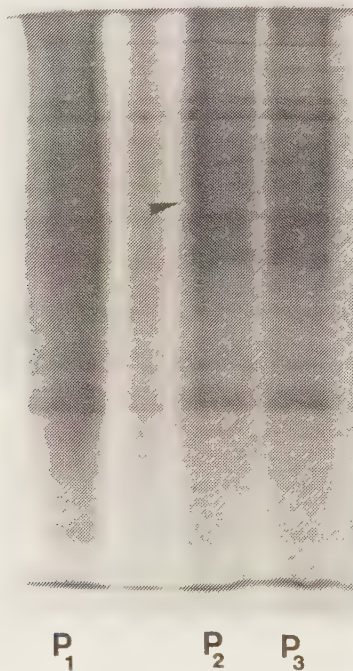


Abb. 19:

Proteinbanden der Membranfraktionen eines angefärbten Gels "P" (P_1 , P_2 und P_3 ; jeweils 0,417 mg Protein/Spur) einen Tag nach der Solubilisierung. Index 1 kennzeichnet die Dunkelkontrolle, Index 2 und 3 die belichteten Proben.

Es zeigte sich, daß die Proteinbande, die bei Belichtung deutlich am Tag der Solubilisierung zu beobachten war, einen Tag später nicht mehr erscheint, während der Rest des Proteinmusters identisch blieb. Es handelt sich also evt. um ein labiles Protein, das vielleicht innerhalb von 24 Stunden abgebaut wird, zumindest aber seine Gesamtladung derart verändert, daß es bei dieser Auftrennung nicht mehr zu beobachten ist.

Ziel weiterer Experimente war es nun zu klären, ob dieses Protein wirklich im Zusammenhang mit Primärreaktionen steht. Dazu mußte ausgeschlossen werden, daß es sich um eine Folgereaktion der Lichtinduktion, wie z.B. die Proteinbiosynthese, handelt. Deshalb wurden Versuche mit Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese an den 80 S Ribosomen gemacht (Rau, Rau-Hund, 1977). Dabei ergab sich jedoch, daß gerade in dem Bereich, wo die nach Belichtung verstärkte Proteinbande zu beobachten ist, eine Veränderung im üblichen Proteinmuster auftrat. Dies galt sowohl für die Dunkelkontrolle als auch für die belichteten Proben. Daher wurde ein anderer experimenteller Weg beschritten. Da man annehmen kann, daß sowohl die Proteinbiosynthese, wie aber auch lichtinduzierte enzymatische Reaktionen ihr Optimum bei *Neurospora crassa* ungefähr bei Raumtemperatur haben, wurden Versuche mit einer vierminütigen Belichtungszeit bei 4°C durchgeführt. Wiederum ließ sich die nach Belichtung verstärkte Proteinbande beobachten, allerdings nur schwach.

Als Interpretationsmöglichkeiten für das Auftreten der nach Belichtung verstärkt auftretenden Proteinbande konnte weder die Proteinbiosynthese, noch eine lichtinduzierte enzymatische Reaktion ausgeschlossen werden.

Jedoch wird durch das Auftreten der nach Belichtung verstärkten Proteinbande auch in der Kälte eine dritte Erklärung wahrscheinlicher: Sie geht von einer rein physikalischen Reaktion, nämlich einer lichtinduzierten Konformationsänderung eines Proteins aus, das dadurch eine erhöhte Affinität zu Membranen erlangt.

Ein weiteres Problem, das sich im Rahmen der nach Belichtung verstärkt auftretenden Proteinbande stellte, war die Frage, ob dieses Protein evt.

doch ein Flavoprotein sein könnte. Aufgrund der gewählten Extraktionsmethodik hätte z.B. trotz aller schonenden Bedingungen das Flavin vom Protein abgespalten werden können. Zur Klärung, ob auf derselben Höhe im Gel, auf der nach Belichtung die verstärkte Proteinbande auftritt, ein Flavoprotein läuft, wurden Experimente gemacht, bei denen jeweils eine Probe, die mit S^{35} -Methionin markiert war, neben einer Probe mit ^{14}C -Riboflavin-Markierung innerhalb eines Gels nebeneinander aufgetragen wurden. Der Grundgedanke war der, daß auch bei Proteinspuren, die mit Methionin markiert sind, wie bei angefärbten Gelen alle Proteinbanden sichtbar werden sollten und so eindeutig eine Zuordnung von Proteinbanden und Flavoproteinen möglich ist. Auf diese Weise können die angefärbten Gele eindeutig den radioaktiven Gelen zugeordnet werden. Experimentell wurde folgendermaßen vorgegangen: 4 Kulturkolben wurden aus der gleichen Sporensuspension beimpft, wobei die Nährlösung von 2 Kulturkolben je 230 μCi S^{35} -Methionin, die der anderen beiden je 15 μCi ^{14}C -Riboflavin enthält. Die Myzelsuspension aus den Kulturkolben mit der gleichen Nährlösung wurde in eine zu belichtende und in eine Dunkelkontrolle aufgeteilt. Auf einem Gel wurden innerhalb eines Laufs die beiden belichteten Proben aus den jeweils verschieden markierten Nährlösungen nebeneinander aufgetragen; entsprechend wurde bei den Dunkelkontrollen vorgegangen. Das bei diesem Experiment erhaltene Ergebnis ist in Abb. 20 dargestellt und zeigt, daß ein Flavoprotein auf der Höhe der nach Belichtung verstärkten Proteinbande läuft.

Man kann also von einer nach Belichtung auftretenden Verstärkung einer Proteinbande sprechen, bei der es sich evt. um ein Flavoprotein handelt. Erklärt werden kann diese am ehesten mit einer durch Licht bedingten Konformationsänderung, aus der eine höhere Affinität zu Membranen resultiert. Bei diesen Membranen handelt es sich nicht um mitochondriale Membranen, da in dieser Fraktion kein Lichteffect beobachtet werden kann. Vielmehr sind es die für die 115 Kp charakteristischen Plasmamembranen oder Membranen des Endoplasmatischen Retikulums.

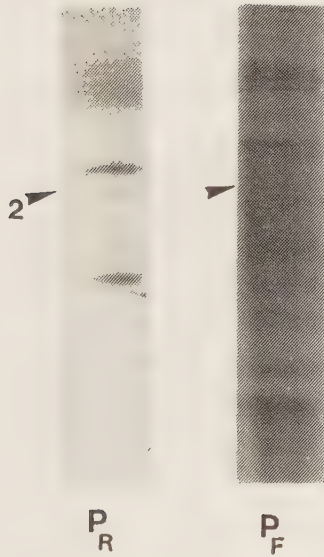


Abb.20:

Auftrennung von angefärbten Proteinen der riboflavinmarkierten belichteten Probe "P_F" und der dazugehörigen radioaktiven Spur "P_R". Die Zuordnung der Banden war mit Hilfe der methioninmarkierten Spur möglich. Da das angefärbte Gel um den Faktor 1,14 bezüglich der Laufrichtung der Gel-Elektrophorese stärker gequollen ist, läuft die Bande des angefärbten Gels auf der Höhe der radioaktiven Bande 2.

Es stellte sich nun die Frage, ob das Flavoprotein, das auf der Höhe der verstärkten Proteinbande läuft, identisch ist mit einem Protein, das bereits im Verlauf der Kompetenz-Entstehung bzw. der Akkomodation eine überproportionale Zunahme zeigte. Um diese Frage zu klären, wurden die radioaktiven Banden der Auftrennung einer Membranfraktion, die von der 9. bis 14. Stunde Kulturdauer markiert worden war, also während der

Kompetenz-Entstehung, mit den radioaktiven Banden einer Auftrennung der Membranfraktion einer belichteten Probe, die von der 0. bis 19. Stunde markiert worden war, verglichen (vgl. Abb. 21).

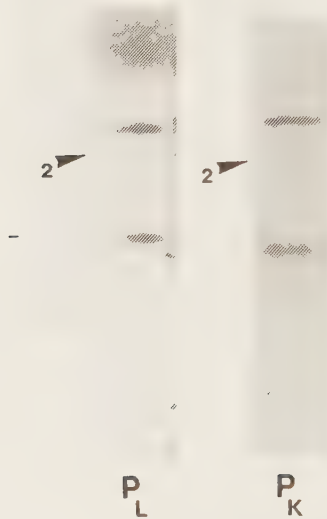


Abb. 21:

" P_K ": Radioaktive Banden der Membranfraktion. Es handelt sich um das Markierungsexperiment mit ^{14}C -Riboflavin von der 9. bis 14. Stunde.
" P_L ": Radioaktive Banden der Membranfraktion einer belichteten Probe, die von 0-19 Stunden mit ^{14}C -Riboflavin markiert wurde.

Als Orientierungshilfe wurden die Standardspuren der dazugehörigen angefärbten Gele benutzt (vgl. Kap. C) 1.3.). Betrachtet man Protein 2 der von 9-14 Stunden markierten Membranfraktion, so läuft dieses mit dem Flavoprotein, das evt. mit dem Protein identisch ist, das nach Belichtung verstärkt auftritt, auf gleicher Höhe.

Die Bande 2 scheint also sowohl bei Experimenten mit kurzen Belichtungszeiten, als auch bei der Kompetenz-Entstehung von Bedeutung zu sein. Hingegen tritt Bande 1 bei der Akkomodation und der Kompetenz-Entstehung überproportional auf.

2.) Ausschluß der Nitratreduktase als möglicher Kandidat

Die Nitratreduktase wird als möglicher UV-Blaulicht-Photoreceptor für die lichtinduzierte Konidienbildung bei *Neurospora crassa* diskutiert (Klemm und Ninnemann, 1978). Deshalb sollte in diesem Kapitel geklärt werden, ob die nach Belichtung verstärkt auftretende Proteinbande auch bei Myzel auftritt, das in einer Nährlösung gewachsen ist, in der die Nitratreduktase nicht induziert wird. In dem für die bislang vorliegenden Versuche verwendeten Nährmedium (mit Ausnahme vom Versuch, der in Abb.20 dargestellt ist) war Ammoniumnitrat enthalten, wodurch die Nitratreduktase induziert wurde. Deshalb wurde ein Flüssignährboden hergestellt, der statt der Nitrat-Ionen eine äquimolare Menge Ammonium-Ionen enthielt. Bestimmte man die Aktivität der Nitratreduktase (Scheideler und Ninnemann, 1986) im Rohextrakt eines unter induzierten (I) und nicht induzierten Bedingungen (N) gewachsenen Myzels, ergeben sich die in Tab. 3 dargestellten Ergebnisse.

Tab.3: Aktivität der Nitratreduktase im Rohextrakt von induziertem "I" und nicht induziertem Myzel "N".

	"N"	"I"
Aktivität der Nitratreduktase $\left[\frac{\text{nmol NO}_2^-}{10 \cdot \text{Protein [mg]}} \right]$	0,000	0,164

Wie die Werte zeigen, ist Aktivität unter induzierten Bedingungen vorhanden, während unter nicht induzierten Bedingungen keine Aktivität nachweisbar ist. Da die lichtinduzierte Proteinbande (vgl. Abb. 20) trotzdem erscheint, ist die Nitratreduktase als möglicher Kandidat für die nach Belichtung verstärkt auftretende Proteinbande auszuschließen.

DISKUSSION

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, ist bei der Identifizierung des für sog. "Blaulicht-Reaktionen" verantwortlichen Photoreceptors die Hauptschwierigkeit, daß in der Zelle zahlreiche Flavoproteine (z.B. Enzyme) vorhanden sind und daß deshalb die Zuordnung eines dieser Flavoproteine zu einem durch Licht gesteuerten Entwicklungs- oder Bewegungsvorgang unsicher ist.

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit einige Charakteristika bei der durch Blaulicht induzierten Carotinoidsynthese bei *Neurospora crassa* ausgewählt, bei denen vermutet werden kann, daß Veränderungen im Flavoproteinmuster wahrscheinlich mit dem Photoreceptor oder der Signalkette im Zusammenhang stehen. Eines dieser Charakteristika ist die "Kompetenz". Wie bereits bei *Sinapis alba* vor einigen Jahren gezeigt, können Keimlinge erst 27 Stunden nach der Aussaat auf eine Hellrotbestrahlung mit der Bildung von Anthocyanen reagieren (Steinitz et al., 1976). Bei *Neurospora crassa* handelt es sich um die Fähigkeit zur lichtinduzierten Carotinoidsynthese, die sowohl beim Wildstamm wie auch bei der *rib-2*-Mutante erst ab einer Kulturdauer von mehr als 9 Stunden vorhanden ist.

Ein anderes Charakteristikum war die sog. "Akkommodation". Es zeigte sich sowohl beim Wildstamm, wie auch bei der *rib-2*-Mutante eine deutlich verstärkte Carotinoidsynthese von kompetentem Myzel nach 2 Stunden langer Inkubation in einem Minimalmedium, also nach *step-down* Bedingungen.

Beide Charakteristika könnten durch Bildung bzw. Veränderungen von Photoreceptormolekülen bzw. eines Proteins der Signalkette bedingt sein. Deshalb wurde, weil der Photoreceptor wahrscheinlich ein Flavo-

protein ist, nach Änderungen im Flavoproteinmuster bei diesen Charakteristika gesucht.

Da der Wildstamm kaum radioaktives Riboflavin aufnahm, wurde eine Riboflavin-auxotrophe Mutante (rib-2-Mutante) für die Markierungsexperimente eingesetzt.

Bei der Akkomodation und bei der Kompetenz wurde ein Flavoprotein gefunden, das bei beiden Phänomenen überproportional zunahm (Bande 1); die mögliche Funktion dieses Flavoproteins soll im folgenden diskutiert werden:

Bei Bande 1, die sowohl bei der Kompetenz-Entstehung beim Vergleich der Markierungsintervalle von der 0. bis 9. und 9. bis 14. Stunde nach dem Einimpfen, wie auch bei der Akkomodation überproportional zunahm, kann ein Zusammenhang mit dem exponentiellen Wachstum bzw. dem Stoffwechsel im Minimalmedium für gering eingeschätzt werden, weil sie bei beiden Phänomenen auftritt.

Eine mögliche Erklärung für die Funktion dieses Flavoproteins wäre die, daß es sich um ein Protein der Transduktionskette handelt. Die Konzentrationssteigerung dieses Proteins würde die vermehrte Bildung von Carotinoiden durch Verstärkung der Primärreaktionen bewirken. Hierbei seien die "mad A-" und "mad B-Mutanten" von *Phycomyces* erwähnt, bei denen durch Defekte in Genprodukten, bei denen es sich um Proteine der Transduktionskette handelt, die Empfindlichkeit auf Licht im Vergleich zum Wildstamm um den Faktor 10^4 - 10^5 herabgesetzt ist (Jayaram et al., 1980). Nimmt man an, daß Flavoprotein Nr. 1 der Photoreceptor ist, so würde seine überproportionale Zunahme bewirken, daß die Primärreaktion bei Belichtung häufiger stattfinden kann, wodurch auch Sekundärreaktionen, wie z.B. die Induktion der carotinoidbildenden Enzyme und die Carotinoidsynthese ansteigt.

Ein weiterer Ansatzpunkt eventuell Informationen über Primärreaktionen zu erhalten, waren Versuche mit kurzen Belichtungszeiten, die dazu dienen sollten, schnelle, durch Belichtung ausgelöste Änderungen auf Proteinebene zu erfassen. Dabei zeigte sich eine deutliche Konzentrationssteigerung eines Proteins bei belichteten Proben (Bande 2) gegenüber Dunkelkontrollen. Beim Vergleich des Flavoproteinmusters ergab sich jedoch kein Unterschied; allerdings läuft auf der Höhe von Bande 2 im Gel ein Flavoprotein. Außerdem könnte die Proteinbande 2 mit dem Flavoprotein 2 identisch sein, das neben Flavoprotein 1 ebenfalls eine überproportionale Zunahme bei der Kompetenz-Entstehung aufweist. Im folgenden soll nun die mögliche Bedeutung dieser Bande 2 diskutiert werden:

Ein Zusammenhang mit der exponentiellen Wachstumsphase, die zur Kompetenz-Entstehung parallel verläuft, ist deshalb unwahrscheinlich, weil diese Bande eventuell auch ein Protein ist, das bei Experimenten mit kurzer Belichtungszeit eine Rolle spielt. Protein 2 tritt auch bei Belichtungsversuchen bei 4°C und nach sehr kurzen Zeiten (4 Minuten nach Belichtungsbeginn) bei belichteten Proben gegenüber Dunkelkontrollen verstärkt auf. Da diese Proteinbande bereits nach 4' erscheint und man annehmen kann, daß das Temperaturoptimum für enzymatische Reaktionen bei *Neurospora* ungefähr bei Raumtemperatur liegt, ist es auch nahezu ausgeschlossen, daß man sie als durch Licht induziertes de novo synthetisiertes Produkt bzw. als ein an die Membran synthetisiertes Produkt einer durch Licht ausgelösten enzymatischen Reaktion diskutiert.

Man könnte aber annehmen, daß es sich um ein durch Licht aktiviertes oder reaktiviertes Enzym (Jagger, 1985) handelt, dessen Gesamtladung sich nach Belichtung derart verändert, daß es überhaupt erst in das Gel eindringt und elektrophoretisch aufgetrennt werden kann. Für die Gesamtladung dieses Proteins in der Dunkelkontrolle müßte man voraussetzen, daß diese ein Eindringen des Proteins in das Gel unmöglich

macht. Da es sich bei einer solchen Aktivierung eines Proteins um einen reinen photochemischen Prozeß handelt, würde dies auch erklären, daß die bei belichteten Proben verstärkt auftretende Proteinbande auch in der Kälte zu beobachten ist.

Ein bis heute noch diskutierter Effekt beim Phytochrom ist die direkte oder indirekte Bindung von aktivem Pfr an zelluläre Membranen bei Avenakoleoptilen (McCurdy und Pratt, 1986).

Diskutiert man Protein 2 von *Neurospora crassa* als Photoreceptor und geht auch hier von einer durch Licht ausgelösten Konformationsänderung aus, woraus eine (erhöhte) Affinität dieses Proteins zu Membranen resultiert, so könnte man dies auf zweierlei Weise erklären:

Entweder ist der Photoreceptor im Dunkeln ein im Cytosol frei lösliches Protein und bekommt erst durch Licht eine Affinität zur Membran. Daraus würde resultieren, daß der Photoreceptor nicht orientiert vorliegt. Für *Neurospora crassa* liegen diesbezüglich keine Erkenntnisse vor, jedoch ist eine Orientierung von Blaulichtphotorezeptoren wie z.B. bei dem von *Sphaerocarpus* (Steiner, 1967) nachgewiesen. Auch bei *Phycomyces*, bei dem eine Orientierung des Photoreceptors gefordert wird, wurde die Zunahme eines Proteinspots bei belichteten Proben gegenüber der Dunkelkontrolle beobachtet (Pollock et al., 1985). Diese Tatsache zeigt, daß dieses Phänomen nicht nur bei *Neurospora* auftritt.

Eine andere Möglichkeit wäre die, daß der Proteinanteil des Photoreceptors im Dunkeln zwar orientiert, aber leichter assoziiert an Membranen vorliegt, als nach Belichtung. Dies hätte zur Folge, daß das Protein in den Dunkelkontrollen (größtenteils) bei der Extraktion der Proteine verloren geht. Die auch bei den Dunkelkontrollen schwach vorhandene Proteinbande könnte man entweder

dadurch erklären, daß das leicht assoziierte Protein nur größtenteils bei der Extraktion verloren geht; andererseits könnte es sich aber um ein anderes Protein gleicher Ladung, aber verschiedener Größe handeln.

Diskutiert man Protein 1 bzw. Protein 2 als Photoreceptor, die beide in den Markierungsintervallen von der 0. bis 7. und 7. bis 9. Stunde nach dem Einimpfen zu beobachten sind, also bereits zu einem Zeitpunkt in dem das Pilzmyzel noch nicht kompetent ist, so müßte man die Existenz von Photoreceptor im nicht-kompetenten Myzel annehmen. Im Gegensatz zu *Sinapis alba*, wo man sicher von der Existenz des Photoreceptors im nicht kompetenten Myzel ausgehen kann, konnte dieser Nachweis bei *Neurospora crassa* nicht erbracht werden. Der Grund für die Nicht-Kompetenz wäre unter der Voraussetzung der Existenz des Photoreceptors im nicht-kompetenten Myzel dann entweder in einem nicht funktionsfähigen Photoreceptor oder aber in einem Defekt der Transduktionskette zu suchen.

Nimmt man an, daß Protein 1 ein Protein der Transduktionskette ist, so kann die Nicht-Kompetenz durch Fehlen oder Defekt des Photoreceptors bzw. verschiedener Faktoren der Transduktionskette diskutiert werden. Die eben genannten verschiedenen Diskussionsmöglichkeiten von Protein 1 und 2 stehen im Einklang mit der Annahme, daß es unwahrscheinlich ist, daß sowohl der Photoreceptor, wie auch alle Bestandteile der Transduktionskette gleichzeitig synthetisiert werden, um so ab einer Kulturdauer von mehr als 9 Stunden eine Kompetenz zu ermöglichen.

Ein Argument, das generell gegen eine Diskussion von Bande 2 und 1 als möglichen Photoreceptor sprechen würde, wäre die offensichtlich hohe Konzentration in der diese Banden auftreten. Dabei sei nochmals an die niedrige spezifische Aktivität von ^{14}C -Riboflavin und

den dennoch hohen Schwärzungsgrad dieser Flavoproteine erinnert, die diese bei der Autoradiographie ergeben. Photoreceptoren sollen nämlich in bereits niedrigen Konzentrationen sehr effektiv wirken können (Presti und Delbrück, 1978). Betrachtet man jedoch Konzentrationen von Phytochrom in etiolierten Haferkoleoptilen von 40 µg pro Gramm Frischgewicht (Eilfeld und Haupt, 1988), kann es durchaus sein, daß weit mehr Photoreceptor vorhanden ist, als für eine effektive Reaktion auf Licht notwendig wäre.

Abschließend soll noch hervorgehoben werden, daß die eben diskutierten Veränderungen von Proteinkonzentrationen ausschließlich in der Membranfraktion gefunden wurden. Da nach vielen Autoren (Brain et al., 1977; Pollock et al., 1985) der Blaulicht-Photoreceptor in der Membran lokalisiert ist, ist ein Zusammenhang dieser Proteine in Richtung Photoreceptor bzw. Signalkette wahrscheinlich. Auch die Tatsache, daß diese Veränderungen während Vorgängen ablaufen, die mit Photoperzeption bzw. Induktion zu tun haben, ist ein weiterer Hinweis für diesen Zusammenhang.

ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) Trotz zahlreicher Untersuchungen in vielen Arbeitsgruppen ist die Suche nach dem sog. Blaulicht-Photoreceptor ("Cryptochrom") und seiner Primärreaktionen bisher noch sehr wenig erfolgreich gewesen. Die vorliegenden Untersuchungen sollten dazu einen Beitrag leisten. Dafür boten einige Charakteristika der lichtinduzierten Carotinoidsynthese bei *Neurospora crassa* neue Ansatzpunkte.
- 2.) Da der wahrscheinlichste Kandidat für den Photoreceptor ein Flavoprotein ist, wurde nach Veränderungen im Flavoproteinstmuster im Myzel während solcher Perioden gesucht, in denen sich die Kapazität für die lichtinduzierte Carotinoidsynthese ändert. Dazu sollten die entsprechenden Proteine mit ^{14}C -Riboflavin markiert werden um sie von anderen Proteinen unterscheiden zu können. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß der Wildstamm von *Neurospora crassa* nicht genügend Riboflavin aufnimmt, wurde für die Untersuchungen eine für Riboflavin auxotrophe Mutante (rib-2-Mutante) eingesetzt.
- 3.) Ein Charakteristikum der lichtinduzierten Carotinoidsynthese ist die "Kompetenz". Darunter versteht man, daß Myzel erst ab einem bestimmten Alter auf Licht mit der Synthese von Carotinoiden reagieren kann. Bei den Experimenten dazu wurde Myzel von verschiedenem Alter belichtet und die anschließend gebildete Carotinoidmenge dieser Proben mit den jeweiligen Dunkelkontrollen verglichen. Sowohl bei der rib-2-Mutante, wie auch beim Wildstamm wurde gefunden, daß Myzel erst ab einer Kulturdauer von mehr als 9 Stunden lichtinduzierte Carotinoidsynthese zeigt, d.h. kompetent wird, Myzel von 9 Stunden noch keine Kompetenz zeigt.

- 4.) Beim Wildstamm und bei der rib-2-Mutante wird die Kapazität zur lichtinduzierten Carotinoidsynthese durch Überführung des Myzels in ein Minimalmedium ("step-down"-Bedingungen) wesentlich erhöht. Die Ursache für dieses als "Akkomodation" bezeichnete Phänomen könnten - ebenso wie bei der Kompetenz-Entstehung - Veränderungen beim Photoreceptor oder in der Signalkette sein.
- 5.) Um zu prüfen, ob im nicht-kompetenten Myzel Photoreceptor funktionsfähig ist, wurde das Vorhandensein eines "Gedächtnisses" untersucht. Nach Belichtung im nicht-kompetenten Zustand und anschließendem Wachstum im Dunklen bis ins kompetente Alter, war keine lichtinduzierte Carotinoidsynthese zu beobachten. Im Gegensatz zur phytochrom-induzierten Anthocyan-synthese von *Sinapis alba* (Steinitz et al., 1976) konnte also weder beim Wildstamm noch bei der rib-2-Mutante ein "Gedächtnis" festgestellt werden.
- 6.) Um Veränderungen im Flavoproteinmuster beobachten zu können, wurde Myzel verschiedener Stadien mit ^{14}C -Riboflavin markiert, geerntet und mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation eine Mitochondrien-, Membran- und lösliche Fraktion gebildet. Es wurden alle Fraktionen mit Hilfe der nativen Gel-Elektrophorese aufgetrennt, um spezifische Veränderungen im Flavoproteinmuster der Membranfraktion von solchen unterscheiden zu können, die auch in der Mitochondrien- und löslichen Fraktion stattfinden. Die Gele wurden z.T. angefärbt, um das Gesamtproteinmuster beobachten zu können. Andererseits wurden Proteine der selben Proben auf anderen Gelen hitzefixiert und zur Detektierung der Flavoproteine auf Röntgenfilme aufgelegt.
- 7.) Bei zeitlich verschiedener Markierung mit ^{14}C -Riboflavin während der Kompetenz-Entstehung konnte eine überproportionale Zunah-

me des durch radioaktive Markierung hervorgerufenen Schwärzungsgrades von 2 Flavoproteinen in der Membranfraktion beobachtet werden (Bande 1 und 2); während Bande 1 auch bei kürzeren Markierungszeiten überproportional zunahm, konnte dies bei Bande 2 wegen zu geringer Markierung nicht beurteilt werden.

- 8.) Beim Vergleich von nicht-akkomodiertem Myzel mit einem während der 2-stündigen Akkomodation markierten Myzel ergab sich wiederum eine überproportionale Zunahme des Schwärzungsgrades der Flavoproteinbande in der Membranfraktion.
- 9.) Um weitere "Informationen" über Primärreaktionen zu erhalten und Sekundärreaktionen möglichst auszuschließen, wurden Veränderungen im Protein- bzw. im Flavoproteinmuster nach kurzer Belichtung untersucht. Bei gelelektrophoretisch aufgetrennten Membranfraktionen trat eine Verstärkung einer Proteinbande bei belichteten Proben gegenüber der Dunkelkontrolle auf. Jedoch ließ sich beim Vergleich der Flavoproteine von belichteten Proben mit Dunkelkontrollen kein Unterschied feststellen.

Die verstärkte Proteinbande nach Belichtung zeigte sich nur am Tag der Solubilisierung. Trennte man die solubilisierete Membranfraktion einen Tag nach der Solubilisierung auf, so zeigte sich keine Verstärkung der Proteinbande mehr. Es könnte sich also eventuell um ein labiles Protein handeln. Die Verstärkung der Proteinbande trat auch bei Belichtung bei 4°C auf, was gegen eine Bildung durch de novo-Synthese spricht.

- 10.) Die Nitratreduktase wird als Blaulicht - Photoreceptor für die lichtinduzierte Konidienbildung von *Neurospora crassa* diskutiert (Klemm und Ninnemann, 1978).

Deshalb wurden solubilisierete belichtete Proben mit Dunkelkontrollen von Myzelien verglichen, bei denen die Nitratreduktase zum einen induziert, zum anderen nicht induziert vorlag. Die bei belichteten Proben verstärkt auftretende Proteinbande trat in beiden Fällen auf. Die Nitratreduktase kann deshalb als Kandidat für die bei belichteten Proben verstärkt auftretende Proteinbande ausgeschlossen werden.

- 11.) Die Zunahme der gleichen Flavoproteinbande sowohl bei der Kompetenz-Entstehung wie auch bei der sog. "Akkommodation" sowie weitere Änderungen auch nach kurzen Belichtungszeiten werden im Hinblick auf einen Zusammenhang mit dem Photoreceptor für die lichtinduzierte Carotinoidsynthese diskutiert. Daß diese Veränderungen in der Membranfraktion auftreten, in der nach vielen Autoren der Photoreceptor lokalisiert sein dürfte, macht diesen Zusammenhang sehr wahrscheinlich.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Beyer, P., Weiss, G. und Kleinig, H. (1985)
Eur. J. Biochem. **153**, 341-346.
- Bonner, W.M. und Laskey, R.A. (1974)
Eur. J. Biochem. **46**, 83-88.
- Brian, D.R., Freeberg, A.J., Weiss, V.G. and Briggs, R.W. (1977)
Plant Physiol. **59**, 948-952.
- McCurdy, D.W. and Pratt, L.H. (1986)
Planta **167**, 339-336.
- De Fabo, E., Harding, R. und Shropshire, W. (1976)
Plant Physiol. **57**, 440-445.
- Drumm, H. and Mohr, H. (1978)
Photochem. Photobiol. **27**, 241-248.
- Eilfeld, P. und Haupt, W. (1988)
In: "Photoreceptor Function and Evolution" (Ed.
by M.G. Holmes), Academic Press (in Press)
- Gressel, J. and Rau, W. (1983)
In: Photomorphogenesis **16** B. Springer, Berlin-
Heidelberg, 603-632.
- Hjelmeland, L.M. (1980)
Proc. Nati. Acad. Sci. USA **77**, 6368-6370.
- Jagger, J. (1985)
In: Solar- UV Actions on Living Cells. Praeger.

- Jayaram M., Leutwiler, L. and Delbrück, M. (1980)
Photochemistry and Photobiology **32**, 241-245.
- Kendrick, R.E. und Kronenberg, G.H.M. (1986)
In: Photomorphogenesis in Plants. Springer, Berlin-Heidelberg-
New York - Tokyo, 137-183.
- Klemm, E. und Ninnemann, H. (1978)
Photochemistry and Photobiology **29**, 629-632.
- Lipson, D. E., Galland, P. and Pollock, J.A. (1984)
In: Blue Light Effects in Biological Systems.
Springer, Berlin - Heidelberg, 228-236.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. **193**, 265.
- Massey, V., Palmer, G., Williams, C.H., Swoboda, B.E.P. and
Sands, R.H. (1966)
In: Flavins and Flavoproteins. Elsevier Publishing
Company, 133-158.
- Maurer, H. R., (1968)
Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter & Co., Berlin
- Mitzka-Schnabel, U. (1978)
Doktorarbeit, Universität München.
- Mohr, H. and van Nes, E. (1963)
Z. Bot. **51**, 1-6.
- Mohr, H. und Oelze-Karow, H. (1973)
Biologie in unserer Zeit **5**, 137-147.

- Pollock, J.A., Lipson, E.D. und Sullivan, D.I. (1985)
Planta **163**, 506-516.
- Presti, D. und Delbrück, M. (1978)
Plant Cell and Environment **1**, 81-100.
- Rau, W. (1967)
Planta **72**, 14-28.
- Rau, W., Lindemann I. und Rau-Hund, A. (1968)
Planta (Berl.), 309-316.
- Rau, W. (1969)
Planta **84**, 30-42.
- Rau, W. (1971)
Planta (Berl.) **101**, 251-264.
- Rau, W. (1975)
Ber.Deutsch.Bot.Ges. **88**, 45.
- Rau, W. und Rau-Hund, A. (1977)
Planta **136**, 49-52
- Rau, W. (1980)
IN: The Blue Light Syndrome. Springer, Berlin -
Heidelberg - New York, 283-298.
- Rüdiger, W. (1987)
Photobiochemistry and Photobiophysics, Suppl., 217-227.
- Rüdiger, W., und Scheer, H. (1983)
In: Photomorphogenesis **16 A**. Springer, Berlin -
Heidelberg, 119-145.

- Scheideler, L. und Ninnemann, H. (1986)
Analytical Biochemistry **154**, 29-33.
- Schnarrenberger, C und Mohr, H. (1970)
Planta **94**, 296.
- Schrott, E. (1980)
Planta **150**, 174-179.
- Schrott, E., Huber-Willer, A. und Rau, W. (1981)
Photochemistry and Photobiology **35**, 213-216.
- Schrott, E. (1981)
Planta **151**, 371-374.
- Schrott, E. (1985)
Pure and Appl. Chem. **57**, 729-734.
- Shropshire, Jr.W. und Withrow, R.B. (1958)
Plant Physiol. **33**, 360-365.
- Shropshire, W. (1974)
Progress in Photobiology. Schenk, G.O. (ed.)
paper No. 024. Frankfurt: Deutsche Gesellschaft
für Lichtforschung.
- Shropshire, W. (1980)
In: The Blue Light Syndrome. Springer, Berlin -
Heidelberg - New York, 172-186.
- Song, P. (1980)
In: The Blue Light Syndrome. Springer, Berlin -
Heidelberg - New York, 159-171.

Steiner, A.M. (1967)

Naturwiss. **54**, 497-498.

Steinitz, B., Drumm, H. und Mohr, H. (1976)

Planta (Berl.) **130**, 23-31.

Theimer, R.R. und Rau, W. (1970)

Planta **94**, 129-137.

Vogel, H.J. und Bonner, D.M. (1956)

Microbiol. Genet. Bull. **13**, 43.

Zalokar, M. (1954)

Arch. Biochem. Biophys. **50**, 71.

Herrn Prof. Dr. W. Rau bin ich für die Überlassung des Themas, für die Anleitung zur vorliegenden Arbeit und für seine immerwährende volle Unterstützung in allen wissenschaftlichen Belangen zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. E. Schrott möchte ich für die Förderung dieser Arbeit und seine hilfreichen Diskussionen vielmals danken.

Auch Herrn Dr. G. Wanner spreche ich hiermit für die elektronenmikroskopischen Bilder und seine interessanten Erklärungen meinen Dank aus.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Elisabeth Seigner für die äußerst wertvollen Beiträge vor allem im Zusammenhang mit der Solubilisierung von Membranproteinen.

Für ihre stetigen und sehr fruchtbaren Diskussionen möchte ich mich auch bei Frau Luitgardis Seigner sehr herzlich bedanken.

Frau Sensburg unterstützte mich hervorragend bei zahlreichen aufwendigen Versuchen, wofür ich ihr ebenfalls sehr herzlich danke.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Rau für die langjährige freundschaftliche und stets hilfsbereite Zusammenarbeit.

Und nicht zuletzt danke ich Frau A. Oettl für die Reinschrift, Frau J. Seifert für die Zeichnungen und Herrn K. Liedl für die Photographien dieses Manuskripts.

L e b e n s l a u f

Am 25.9.1956 wurde ich, Angelika Reger, als erstes Kind des Studiendirektors Dr. E. Reger und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Petter, in München geboren. 1967 trat ich von der Volksschule auf das Gymnasium über. Dort machte ich 1976 mein Abitur. Zum Wintersemester 1976/77 begann ich mit dem Lehramtsstudium für Chemie/Biologie für Gymnasien und absolvierte 1983 die Diplom-Hauptprüfung und das 1. Staatsexamen in Biologie und Chemie. Im Botanischen Institut der Universität München begann ich 1983 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Rau mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

